

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

(21) **PI0609615-8 A2**



* B R P I O 6 0 9 6 1 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 30/03/2006
(43) Data da Publicação: 27/04/2010
(RPI 2051)

(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/68 (2010.01)

(54) Título: **MÉTODOS DE PREDIÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTO DE AGENTE DE LIGAÇÃO ESPECÍFICA A EGFr EM TRATAMENTO DE CÂNCER RELACIONADO COM EGFr NUM SUJEITO, DE TRATAMENTO DO MESMO E DE DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTO EM PACIENTE**

(57) Resumo: Métodos de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de Tratamento do Mesmo e de Determinação da Eficácia de Tratamento em Paciente. São proporcionados métodos de predição sobre se um tratamento de agente de ligação específica a receptor do fator de crescimento anti-epidérmico ("EGFr") será eficaz no tratamento do câncer e métodos de tratamento de pacientes com agentes de ligação específica a EGFr.

(30) Prioridade Unionista: 01/04/2005 US 60/667,827

(73) Titular(es): AMGEN INC.

(72) Inventor(es): Alberto Bardelli, Mauro Moroni, Salvatore Siena

(74) Procurador(es): HUGO SILVA , ROSA & MALDONADO - PROP. INT

(86) Pedido Internacional: PCT US2006012267 de 30/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/107854 de 12/10/2006

Pat 020070158261
Pr 0609615-8

1/96

**“Métodos de Predição da Eficácia de Tratamento de
Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer
Relacionado com EGFr num Sujeito, de Tratamento do Mesmo e de
Determinação da Eficácia de Tratamento em Paciente”**

5 **Relatório Descritivo**

Este pedido reivindica o benefício do pedido provisório US 60/667.827, depositado em 1 de abril de 2005. O pedido provisório US 60/667.827 é incorporado aqui como referência em sua totalidade para qualquer propósito.

10 **Campo**

O presente pedido refere-se a métodos para prever se um tratamento com um agente de ligação específica anti-receptor do fator de crescimento epitelial (“EGFr”) será eficaz no tratamento de câncer e a métodos para o tratamento de pacientes com agentes de ligação específica anti-EGFr. São providos métodos de determinação de eficácia do
15 tratamento.

Antecedentes

Certas aplicações de anticorpos monoclonais em terapia do câncer são baseadas na capacidade do anticorpo de liberar especificamente para os tecidos cancerosos funções efetoras citotóxicas tais como isotipos, toxinas ou drogas amplificadoras do sistema imunológico. Uma abordagem alternativa é utilizar-se anticorpos monoclonais para afetar diretamente a sobrevivência das células tumorais as privando de sinais de proliferação extracelulares essenciais, tais como os mediados
20 pelos fatores de crescimento através de seus receptores. Um dos alvos atrativos nesta abordagem é o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFr), que liga EGF e o fator de crescimento transformante α (TGF α) (ver, por exemplo, Ullrich e colaboradores, *Cell* **61**:203-212, 1990; Baselga e colaboradores, *Pharmacol. Ther.* **64**:127-154, 1994; Mendel-

sohn e colaboradores, em *Biologic Therapy of Cancer* 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1995; Fan e colaboradores, *Curr. Opin. Oncol.* **10**:67-73, 1998). A ligação de EGF ou TGF α a EGFr, uma glicoproteína de superfície celular transmembrana de 170 kDa, aciona uma cascata de eventos celulares bioquímicos, incluindo autofosforilação e internalização de EGFr, que culmina na proliferação celular (ver, por exemplo, Ullrich e colaboradores, *Cell* **61**:203-212, 1990).

Várias observações implicam o EGFr no suporte do desenvolvimento e progressão de tumores sólidos humanos. Demonstrou-se que o EGFr é super-expresso em muitos tipos de tumores sólidos humanos (ver, por exemplo, Mendelsohn *Cancer Cells* **7**:359 (1989), Mendelsohn *Cancer Biology* **1**:339-344 (1990), Modjtahedi e Dean *Int'l J. Oncology* **4**:277-296 (1994)). Por exemplo, a super-expressão de EGFr foi observada em certos carcinomas de pulmão, mama, cólon, gástricos, cerebrais, de bexiga, cabeça e pescoço e próstata (ver, por exemplo, Modjtahedi e Dean *Int'l J. Oncology* **4**:277- 296 (1994)). Certos grupos reportaram que um aumento dos níveis do receptor está associado a uma prognose clínica pobre (ver, por exemplo, Baselga e colaboradores *Pharmacol. Ther.* **64**:127-154, 1994; Mendelsohn e colaboradores, *Biologic Therapy of Cancer* pp. 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1995; Modjtahedi e colaboradores, *Intl. J. of Oncology* **4**:277-296, 1994; Gullick, *Br. Medical Bulletin*, **47**:87-98, 1991; Salomon e colaboradores, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **19**:183-232, 1995). Outros estudos, entretanto, sugerem que a prognose não pode ser diretamente correlacionada à super-expressão de EGFr (ver, por exemplo, Rusch e colaboradores *Clin. Cancer Res.* **3**:515-522, 1997; Pfeiffer e colaboradores, *Br. J. Cancer* **74**:86-91, 1996; Fontanini e colaboradores, *Clin. Cancer Res.* **4**:241-249, 1998; Greatens e colaboradores, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **157**:1093-1097, 1998; D'Amico e colaboradores, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **117**:736- 743, 1999; Pastorino e colaboradores, *J. Clin.*

Oncol. **15**:2858-2865, 1997). Foi demonstrado que tanto o fator de crescimento epitelial (EGF) quanto o fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) se ligam a EGFr e levam à proliferação celular e crescimento tumoral. Em muitos casos, a expressão superficial aumentada de EGFr
5 foi acompanhada pela produção de TGF α ou EGF pelas células tumorais, sugerindo o envolvimento de um controle de crescimento autócrino na progressão destes tumores (ver, por exemplo, Baselga e colaboradores *Pharmacol. Ther.* **64**: 127-154, 1994; Mendelsohn e colaboradores, *Biologic Therapy of Cancer* pp. 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott
10 Co., 1995; Modjtahedi e colaboradores, *Intl. J. of Oncology* **4**:277-296, 1994; Salomon e colaboradores, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **19**: 183-232, 1995).

Desta forma, certos grupos propuseram que anticorpos contra EGF, TGF- α e EGFr poderiam ser úteis na terapia de tumores que
15 expressam ou super-expressão EGF-r (ver, por exemplo, Mendelsohn *Cancer Cells* **7**:359 (1989), Mendelsohn *Cancer Biology* **1**:339-344 (1990), Modjtahedi e Dean *Int'l J. Oncology* **4**:277-296 (1994), Tosi e colaboradores *Int'l J. Cancer* **62**:643-650 (1995)). De fato, foi demonstrado que anticorpos anti-EGFr que bloqueiam a ligação de EGF e TGF- α
20 ao receptor parecem inibir a proliferação de células tumorais. Ao mesmo tempo, entretanto, anticorpos anti-EGFr aparentemente não inibem o crescimento celular independente de EGF e TGF- α (Modjtahedi e Dean *Int'l J. Oncology* **4**:277-296 (1994)).

Anticorpos monoclonais específicos para o EGFr humano,
25 capazes de neutralizar a ligação de EGF e TGF α a células tumorais e de inibir a proliferação celular mediada por ligante *in vitro*, foram gerados a partir de camundongos e ratos (ver, por exemplo, Baselga e colaboradores, *Pharmacol. Ther.* **64**: 127-154, 1994; Mendelsohn e colaboradores, em *Biologic Therapy of Cancer* 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott
30 Co., 1995; Fan e colaboradores, *Curr. Opin. Oncol.* **10**:67-73, 1998;

Modjtahedi e colaboradores, *Intl. J. Oncology* **4**: 277-296, 1994). Alguns destes anticorpos, tais como os anticorpos monoclonais de camundongo 108, 225 (ver, por exemplo, Aboud-Pirak e colaboradores, *J. Natl. Cancer Inst.* **80**:1605-1611, 1988) e 528 (ver, por exemplo, Baselga e colaboradores, *Pharmacol. Ther.* **64**:127-154, 1994; Mendelsohn e colaboradores, em *Biologic Therapy of Cancer* 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1995) ou os de rato ICR16, ICR62 e ICR64 (ver, por exemplo, Modjtajedi e colaboradores, *Intl. J. Oncology* **4**:277-296, 1994; Modjtahedi e colaboradores, *Br. J. Cancer* **67**:247-253, 1993; Modjtahedi e colaboradores, *Br. J. Cancer* **67**:254-261, 1993), foram avaliados extensivamente para sua habilidade em afetar o crescimento tumoral em modelos de xenoenxerto em camundongos. A maioria dos anticorpos monoclonais anti-EGFr são eficazes na prevenção da formação de tumor em camundongos atímicos quando administrados com as células tumorais humanas (Baselga e colaboradores *Pharmacol. Ther.* **64**:127-154, 1994; Modjtahedi e colaboradores, *Br. J. Cancer* **67**:254-261, 1993). Quando injetados em camundongos portadores de xenoenxertos de tumor humano estabelecidos, os anticorpos monoclonais de camundongo 225 e 528 provocaram a regressão parcial do tumor e necessitaram a co-administração de agentes quimioterápicos, tais como doxorubicina ou cisplatina, para a erradicação dos tumores (Baselga e colaboradores *Pharmacol. Ther.* **64**:127-154, 1994; Mendelsohn e colaboradores, in *Biologic Therapy of Cancer* 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1995; Fan e colaboradores, *Cancer Res.* **53**:4637-4642, 1993; Baselga e colaboradores, *J. Natl. Cancer Inst.* **85**:1327-1333, 1993). Uma versão quimérica do anticorpo monoclonal 225 (C225), no qual as regiões variáveis do anticorpo de camundongo são ligadas a regiões constantes humanas, exibiu uma atividade anti-tumoral *in vivo*, no entanto apenas a altas doses (ver, por exemplo, Goldstein e colaboradores, *Clinical Cancer Res.* **1**:1311-1318, 1995; Prewett e colaboradores, *J.*

Immunother. Emphasis Tumor Immunol. **19**:419-427, 1996). Os anticorpos de rato ICR16, ICR62 e ICR64 provocaram a regressão de tumores estabelecidos, mas não sua erradicação completa (Modjtahedi e colaboradores, *Br. J. Cancer* **67**:254-261, 1993). Estes resultados estabeleceram o EGFr como um alvo promissor para terapia de anticorpo contra tumores sólidos que expressam EGFr e conduziram a ensaios clínicos humanos com o anticorpo monoclonal C225 em cânceres sólidos humanos múltiplos (ver, por exemplo, Baselga e colaboradores *Pharmacol. Ther.* **64**:127-154, 1994; Mendelsohn e colaboradores, *Biologic Therapy of Cancer* pp. 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1995; Modjtahedi e colaboradores, *Intl. J. of Oncology* **4**:277-296, 1994).

Certos avanços nas técnicas biológicas tornaram possível a produção de um anticorpo anti-EGFr humano completo. Utilizando camundongos transgênicos para genes de imunoglobulina humana (tecnologia Xenomouse™, Abgenix, Inc.), anticorpos humanos específicos para EGFr humano foram desenvolvidos (ver, por exemplo, Mendez, *Nature Genetics*, **15**:146-156, 1997; Jakobovits, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **31**(1-2):33-42, 1998; Jakobovits, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **7**(4):607-614, 1998; Yang e colaboradores, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **38**(1):17-23, 2001; WO 98/24893; WO 98/50433). Mostrou-se que um destes anticorpos, panitumumab, um anticorpo monoclonal IgG2 humano com uma afinidade de 5×10^{-11} M para EGFr humano, bloqueia a ligação de EGF ao EGFr, para bloquear a sinalização do receptor e inibe a ativação e proliferação de célula tumoral *in vitro* (ver, por exemplo, WO 98/50433; Patente US 6.235.883). Estudos em camundongos atímicos demonstraram que o panitumumab apresenta também atividade *in vivo*, não apenas prevenindo a formação de xenoenxertos A431 de carcinoma epidermóide humano em camundongos atímicos, mas também erradicando xenoenxertos tumorais A431 grandes já estabelecidos (ver, por exemplo, Yang e colaboradores, *Crit.*

Rev. Oncol. Hematol. **38**(1):17-23, 2001; Yang e colaboradores, *Cancer Res.* **59**(6):1236-43, 1999). O panitumumab foi considerado para o tratamento de carcinoma renal, adenocarcinoma colo-retal, câncer de próstata e carcinoma de pulmão escamoso de célula não pequena, entre
5 outros cânceres (ver, por exemplo, publicação do pedido de patente US nº 2004/0033543) e ensaios clínicos estão em curso com este anticorpo.

Em certos tipos de célula, a ligação de fatores de crescimento, tais como EGFr, previne a apoptose por estímulo da fosfatidilinositol 3-quinase ("PI3K") e B-Raf. A ativação da PI3K aciona uma cascata
10 molecular que conduz à sub-regulação das rotas centrais que controlam a morte celular programada (Yao, R., *Science* **267**:2003-2006, 1995). Membros da família Raf foram também identificados como reguladores da morte celular programada em mamíferos (Hunter, *Cell* **80**:225-236, 1995). No bloqueio de Raf, camundongos carentes de B-Raf mostraram
15 alterações na sobrevivência celular, enquanto camundongos carentes de Raf-1 ou A-Raf não mostraram tais alterações (ver, por exemplo, Pritchard, *Curr. Biol.* **6**:614-617, 1996; Wojnowski, *Nat. Genet.* **16**:293-297, 1997), indicando que B-Raf pode apresentar funções específicas na regulação da morte celular. Tanto a PI3K quanto B-Raf são de interesse
20 em distúrbios da proliferação celular, particularmente câncer.

Sumário

Em certas realizações, é provido um método para prever se um tratamento com agente de ligação específica para EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr em um indivíduo,
25 compreendendo a determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma amostra do indivíduo, onde a presença de um número de cópias aumentado do gene de EGFr na amostra indica que um tratamento com agente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr no indivíduo.

30 Em certas modalidades, é provido um método para o trata-

mento de um indivíduo apresentando um câncer relacionado com EGFr, que compreende: (a) a determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma amostra do indivíduo; (b) determinação de se há um número de cópias aumentado do gene de EGFr na amostra; e (c) se
5 houver um número de cópias aumentado do gene de EGFr, administrar ao indivíduo uma quantidade farmacologicamente efetiva de um agente de ligação específica de EGFr.

Em certas modalidades, é provido um método para a determinação da eficácia de um tratamento em um paciente, que compreende: (a) determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma
10 primeira amostra obtida de um paciente para se obter um primeiro nível do número de cópias do gene de EGFr; (b) administração do tratamento ao paciente; (c) determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma segunda amostra do paciente no momento seguinte à administra-
15 ção do tratamento, gerando desta forma um segundo nível do número de cópias do gene de EGFr; e (d) comparação dos primeiro e segundo níveis do número de cópias do gene de EGFr, onde uma redução do número de cópias do gene de EGFr no segundo nível do número de cópias do gene de EGFr em relação ao nível do número de cópias do gene de EGFr
20 indica que o tratamento é efetivo no paciente.

Breve Descrição das Figuras

As **Figuras 1A-1D** são imagens de análises como o ensaio de FISH dupla-cor conforme observadas por microscópio fluorescente, de acordo com o trabalho descrito no Exemplo 3. Em todas as quatro
25 figuras, os genes de EGFr aparecem em vermelho e as seqüências CEP7 aparecem em verde. A **Figura 1A** mostra o padrão de marcação de células da mucosa colo-retal normais. A **Figura 1B** mostra o padrão de marcação de células tumorais do paciente 7. A **Figura 1C** mostra o padrão de marcação de células tumorais do paciente 4. A **Figura 1D**
30 mostra o padrão de marcação de células tumorais do paciente 1.

A **Figura 2A** é um Western blot mostrando o nível de expressão de EGFr em diferentes linhagens celulares de carcinoma col-retal, de acordo com o trabalho descrito no Exemplo 4. A **Figura 2B** é uma imagem de uma análise por ensaio de FISH dupla-cor de células de carcinoma colo-retal DiFi conforme observada por microscópio fluorescente, de acordo com o trabalho descrito no Exemplo 4. Os genes EGFr aparecem em vermelho e as seqüências CEP7 aparecem em verde.

Descrição Detalhada De Certas Modalidades Preferidas

Todas as referências citadas aqui, incluindo patentes, pedidos de patente, artigos, livros texto e outros, as referências aqui citadas, desde que já não o sejam, são desta forma incorporadas aqui como referência em sua totalidade. Os títulos das seções utilizados aqui têm o propósito apenas organizacional e não devem ser entendidos como limitantes do assunto descrito.

Definições

A não ser que definidos de outra forma, os termos científicos e técnicos utilizados em conexão com a presente invenção, têm o significado comumente entendido pelos especialistas na técnica. Além disto, a não ser que requerido pelo contexto de forma diferente, os termos no singular devem incluir as plurais e os termos no plural devem incluir os singulares.

Em geral, as nomenclaturas utilizadas em conexão com e técnicas de, cultura de célula e tecido, biologia molecular e química e hibridização de proteína e oligo ou polinucleotídeo descritas aqui, são as bem conhecidas e comumente utilizadas na técnica. Técnicas padrão são utilizadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeo e cultura e transformação de tecido (por exemplo, eletroporação, lipofecção). As reações enzimáticas e técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou conforme realizadas comumente na técnica ou conforme descritas aqui. As técnicas e

procedimentos precedentes são em geral realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e conforme descritos em várias referências genéricas ou mais específicas que são citadas e discutidas no presente relatório. Ver por exemplo, Sambrook e colaboradores *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que é incorporada aqui como referência. As nomenclaturas utilizadas em conexão com e os procedimentos e técnicas laboratoriais de, química analítica, química orgânica sintética e química médica e farmacêutica descritos aqui são aqueles bem conhecidos e comumente utilizados na técnica. As técnicas padrão são utilizadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação, administração e tratamento de pacientes.

Neste pedido, a utilização de “ou” significa “e/ou” a não ser que afirmado diferentemente. Além disto, a utilização do termo “incluindo”, bem como outras formas, tais como “inclui” e “incluído”, não é limitante. Da mesma forma, termos tais como “elemento” ou “componente” englobam tanto elementos quanto componentes compreendendo uma unidade e elementos e componentes que compreendem mais de uma sub-unidade, a não ser que especificamente afirmado diferente.

Conforme utilizados de acordo com o presente relatório, os termos a seguir, a não ser que de outra forma indicado, devem ser entendidos como tendo os seguintes significados:

Os termos “polinucleotídeo isolado” e “ácido nucléico isolado” são utilizados de forma permutável e conforme utilizados aqui devem significar polinucleotídeo de origem genômica, cDNA, ou sintética ou alguma combinação destes, que tendo em vista sua origem (1) não está associado com todo ou parte de um polinucleotídeo no qual o “polinucleotídeo isolado” é encontrado na natureza, (2) está operativamente ligado a um polinucleotídeo ao qual não está ligado na natureza, ou (3)

não ocorre na natureza como parte de uma seqüência maior.

Os termos “proteína isolada” e “polipeptídeo isolado” são utilizados de forma permutável e conforme utilizados aqui significam uma proteína de cDNA, RNA recombinante, ou de origem sintética, ou alguma
5 combinação destes, a qual tendo em vista sua origem, ou fonte de derivação, (1) não está associada com proteínas encontradas na natureza, (2) é livre de outras proteínas provenientes da mesma fonte, por exemplo, livre de proteínas de murino, (3) é expressa por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza.

10 Os termos “polipeptídeo” e “proteína” são utilizados de forma permutável e são utilizados aqui como um termo genérico para se fazer referência à proteína nativa, fragmentos, peptídeos ou análogos de uma seqüência de polipeptídeo. Desta forma, proteína nativa, fragmentos e análogos são espécies do gênero polipeptídeo.

15 O termo “polipeptídeo EGFr” engloba a proteína nativa, bem como fragmentos, análogos e mutantes de uma proteína nativa. Assim, a proteína EGFr nativa, bem como fragmentos, análogos e mutantes da proteína EGFr nativa são espécies do gênero polipeptídeo EGFr.

A terminologia “X#Y” no contexto de uma mutação em uma
20 seqüência de polipeptídeo é conhecida na técnica, onde “#” indica o local da mutação em termos do número do aminoácido do polipeptídeo, “X” indica o aminoácido encontrado nesta posição na seqüência de aminoácidos do tipo selvagem e “Y” indica o aminoácido mutante nesta posição. Por exemplo, a notação “G13D” com referência ao polipeptídeo Rãs
25 indica que há uma glicina no aminoácido número 13 da seqüência de Ras do tipo selvagem e que a glicina é substituída por uma ácido aspártico na seqüência Ras mutante.

O termo “de ocorrência natural” conforme utilizado aqui aplicado a um objeto refere-se ao fato do objeto poder ser encontrado na
30 natureza. Por exemplo, uma seqüência de polipeptídeo ou polinucleotí-

deo que está presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolada de uma fonte natural e que não foi intencionalmente modificada pelo homem no laboratório ou de outra forma qualquer, é de ocorrência natural.

5 O termo “operativamente ligado” conforme utilizado aqui refere-se ao posicionamento de componentes tais que estão em uma relação que os permite funcionar em sua maneira pretendida. Uma seqüência de controle “operativamente ligada” a uma seqüência de codificação é ligada de tal forma que a expressão da seqüência de
10 codificação é obtida sob condições compatíveis com as seqüências de controle.

O termo “seqüência de controle” conforme utilizado aqui refere-se a seqüências de polinucleotídeo que são necessárias para possibilitar a expressão e processamento das seqüências de codificação
15 às quais estão ligadas. A natureza de tais seqüências de controle difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotos, tais seqüências de controle em geral incluem promotor, sítio de ligação ribossômico e seqüências de terminação de transcrição; em eucariotos, em geral, tais seqüências de controle incluem promotores e seqüências de terminação
20 de transcrição. O termo “seqüências de controle” pretende incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença seja essencial para a expressão e processamento e pode incluir também componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, seqüências líder e seqüências de fusão.

25 O termo “polinucleotídeo” conforme utilizado aqui significa uma forma polimérica de nucleotídeos de pelo menos 10 bases em comprimento, ou ribonucleotídeos ou desoxinucleotídeos ou uma forma modificada de ambos os tipos de nucleotídeo. O termo inclui formas de DNA de fita única e fita dupla.

30 O termo “oligonucleotídeo” utilizado aqui inclui nucleotídeos

de ocorrência natural e modificados ligados entre si por ligações de ocorrência natural e não natural de oligonucleotídeos. Oligonucleotídeos são um sub-conjunto de polinucleotídeo em geral apresentando um comprimento de 200 bases ou menos. Preferivelmente oligonucleotídeos contêm de 10 a 60 bases de comprimento e com maior preferência 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 a 40 bases de comprimento. Os oligonucleotídeos são usualmente de fita única, por exemplo, para sondas, embora os oligonucleotídeos possam ser de fita dupla, por exemplo, para utilização na construção de um gene mutante. Os oligonucleotídeos da invenção podem ser oligonucleotídeos senso ou anti-senso.

O termo “nucleotídeos de ocorrência natural” utilizado aqui inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo “nucleotídeos modificados” utilizado aqui inclui nucleotídeos com grupos sacarídeos modificados ou substituídos e outros. O termo “ligações de oligonucleotídeo” utilizado aqui inclui ligações de oligonucleotídeo tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato e outros. Ver, por exemplo, LaPlanche e colaboradores *Nucl. Acids Res.* **14**:9081 (1986); Stec e colaboradores *J. Am. Chem. Soc.* **106**:6077 (1984); Stein e colaboradores *Nucl. Acids Res.* **16**:3209 (1988); Zon e colaboradores *Anti-Cancer Drug Design* **6**:539 (1991); Zon e colaboradores *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)); Stec e colaboradores, Patente US 5.151.510; Uhlmann e Peyman *Chemical Reviews* **90**:543 (1990), as descrições dos quais são incorporadas aqui como referência. Um oligonucleotídeo pode incluir um rótulo para detecção, se desejado.

O termo “número de cópias” de um ácido nucléico refere-se ao número de unidades discretas deste ácido nucléico em uma dada amostra. Um “número de cópias do gene de EGFr” em uma amostra

refere-se ao número de cópias discretas de um gene de EGFr nesta amostra. Um “número de cópias aumentado do gene de EGFr” em uma amostra significa que o número de cópias discretas do gene de EGFr em uma amostra está aumentado em relação a uma referência. Em certas realizações, a referência é uma outra amostra. Em algumas de tais realizações, a referência é uma outra amostra retirada do mesmo indivíduo. Em algumas de tais realizações, a referência é uma outra amostra retirada de um indivíduo diferente. Em algumas de tais realizações, a referência é o número de cópias do gene de EGFr característico de uma população particular.

O termo “hibridiza-se seletivamente” utilizado aqui significa ligação detectável e específica. Polinucleotídeos, oligonucleotídeos e fragmentos destes se hibridizam seletivamente a fitas de ácido nucléico sob condições de hibridização e lavagem que minimizam quantidades apreciáveis de ligação detectável a ácidos nucléicos não específicos. Condições de alta severidade podem ser utilizadas para se obter condições de hibridização seletivas como conhecido na técnica e discutido aqui. Em geral, a homologia de seqüência de ácidos nucléicos entre polinucleotídeos, oligonucleotídeos e fragmentos e uma seqüência de ácidos nucléicos de interesse será de pelo menos 80% e mais tipicamente com homologias preferivelmente crescentes de pelo menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e 100%. Duas seqüências de aminoácidos são homólogas se existe uma identidade parcial ou completa entre suas seqüências. Por exemplo, uma homologia de 85% significa que 85% dos aminoácidos são idênticos quando as duas seqüências são alinhadas para um pareamento máximo. Espaços (em uma das duas seqüências sendo comparadas) são permitidos na maximização do pareamento; os comprimentos dos espaços de 5 ou menos são preferidos com 2 ou menos sendo o de maior preferência. Alternativamente e preferivelmente, duas seqüências de proteína (ou seqüências de polipeptídeo deriva-

das destas de pelo menos 30 aminoácidos de comprimento) são homólogas, conforme o termo é utilizado aqui, se apresentam um alinhamento de mais de 5 (em unidades de desvio padrão) utilizando-se o programa ALIGN com a matriz de dados de mutação e uma perda em termos de espaço de 6 ou mais. Ver Dayhoff, M.O., em *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) e Suplemento 2 deste volume, pp. 1-10. As duas seqüências ou partes destas são com maior preferência homólogas se seus aminoácidos são 50% ou mais idênticos, quando idealmente alinhados utilizando-se o programa ALIGN. O termo “corresponde a” é utilizado para significar que uma seqüência de polinucleotídeo é homóloga (isto é, é idêntica, não relacionadas estritamente por evolução) a toda ou parte de uma seqüência de polinucleotídeo de referência, ou que uma seqüência de polinucleotídeo é idêntica a uma seqüência de polinucleotídeo de referência. Em contraste, o termo “complementar a” é utilizado aqui para significar que a seqüência complementar é homóloga a toda ou parte de uma seqüência de polinucleotídeo de referência. Para ilustração, a seqüência de nucleotídeos “TATAC” corresponde a uma seqüência de nucleotídeos de referência “TATAC” e é complementar a uma seqüência de nucleotídeos de referência “GTATA”.

Os termos a seguir são utilizados para descrever as relações de seqüência entre duas ou mais seqüências de polinucleotídeo ou aminoácidos: “seqüência de referência”, “janela de comparação”, “identidade de seqüência”, “percentagem de identidade de seqüência” e “identidade substancial”. Uma “seqüência de referência” é uma seqüência definida utilizada como base para uma comparação de seqüência; uma seqüência de referência pode ser um sub-conjunto de uma seqüência maior, por exemplo, um segmento de um cDNA ou seqüência genética com comprimento total fornecidos em uma listagem de seqüências, ou pode compreender um cDNA ou seqüência genética completos. Em

geral, uma seqüência de referência tem um comprimento de pelo menos 18 nucleotídeos ou 6 aminoácidos, freqüentemente pelo menos 24 nucleotídeos ou 8 aminoácidos de comprimento e freqüentemente pelo menos 48 nucleotídeos ou 16 aminoácidos de comprimento. Uma vez que duas seqüências de polinucleotídeo ou aminoácidos podem cada uma (1) compreender uma seqüência (isto é, uma parte da seqüência completa de polinucleotídeo ou aminoácidos) que é similar entre as duas moléculas e (2) pode compreender adicionalmente uma seqüência que diverge entre as duas seqüências de polinucleotídeo ou aminoácidos, as comparações de seqüência entre duas moléculas (ou mais) são tipicamente realizadas pela comparação das seqüências das duas moléculas em uma “janela de comparação” para identificar e comparar regiões locais de similaridade de seqüência. Uma “janela de comparação”, conforme utilizado aqui, refere-se a um segmento conceitual de pelo menos 18 posições de nucleotídeos ou 6 de aminoácidos contíguas em que uma seqüência de polinucleotídeo ou seqüência de aminoácidos podem ser comparadas a uma seqüência de referência de pelo menos 18 nucleotídeos ou 6 aminoácidos contíguos e onde a parte da seqüência de polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições, deleções, substituições e semelhantes (isto é, espaços) de 20 por cento ou menos quando em comparação com a seqüência de referência (que não compreende adições ou deleções) para o alinhamento ideal das duas seqüências. É selecionado o alinhamento ideal de seqüências para uma janela de comparação pode ser realizado pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman *Adv. Appl. Math.* **2**:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch *J. Mol. Biol.* **48**:443 (1970), pela busca pelo método de similaridade de Pearson e Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **85**:2444 (1988), por implementações em computador destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package versão 7.0, (Genetics Computer

Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, ou pacotes de programas MacVector), ou por inspeção e o melhor alinhamento (isto é, resultando na percentagem de homologia mais alta na janela de comparação) gerado pelos vários métodos.

5 O termo “identidade de seqüência” significa que duas seqüências de polinucleotídeo ou aminoácidos são idênticas (isto é, em uma base nucleotídeo-a-nucleotídeo ou resíduo-a-resíduo) na janela de comparação. A “percentagem de identidade de seqüência” é calculada por comparação de duas seqüências idealmente alinhadas na janela de
10 comparação, determinação do número de posições em que ocorrem bases de ácido nucléico (por exemplo, A, T, C, G, U ou I) ou resíduos idênticos em ambas as seqüências para produzir o número de posições que combinam, divisão do número de posições que combinam pelo número total de posições na janela de comparação (isto é, o tamanho da
15 janela) e multiplicação do resultado por 100 para se obter a percentagem de identidade de seqüência. O termo “identidade substancial” conforme utilizado aqui denota uma característica de uma seqüência de polinucleotídeo ou aminoácidos, onde o polinucleotídeo ou aminoácidos compreendem uma seqüência que apresenta pelo menos 85% de
20 identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos de 90 a 95% de identidade de seqüência, mais usualmente pelo menos 96, 97, 98 ou 99% de identidade de seqüência quando em comparação com uma seqüência de referência em uma janela de comparação de pelo menos 18 posições de nucleotídeos (6 aminoácidos), freqüentemente em uma
25 janela de pelo menos 24-48 posições de nucleotídeos (8-16 aminoácidos), onde a percentagem da identidade de seqüência é calculada por comparação da seqüência de referência com a seqüência que pode incluir deleções ou adições que totalizam 20% ou menos da seqüência de referência na janela de comparação. A seqüência de referência pode
30 ser um sub-conjunto de uma seqüência maior.

Conforme utilizados aqui, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem a utilização convencional. Ver *Immunology - A Synthesis* (2ª Edição, E.S. Golub e D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que é incorporado aqui como referência. O termo “aminoácido” ou “resíduo de aminoácido”, conforme utilizados aqui, referem-se a L aminoácidos ou D aminoácidos de ocorrência natural. As abreviações comumente utilizadas de uma ou três letras para aminoácidos são utilizadas aqui (Bruce Alberts e colaboradores, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., New York (4ª ed. 2002)). Os estereoisômeros (por exemplo, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais tais como aminoácidos α,α -di-substituídos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais podem também ser componentes adequados para polipeptídeos da presente invenção. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina e outros aminoácidos e iminoácidos semelhantes (por exemplo, 4-hidroxiprolina). Na notação de peptídeo utilizada aqui, o direção da esquerda é o direção terminal amino e a direção da direita é a direção terminal carboxi, de acordo com o uso padrão e a convenção.

Similarmente, a não ser que especificado de forma diferente, a extremidade da esquerda das seqüências de polinucleotídeo de fita única é a extremidade 5' e a direção da esquerda das seqüências de polinucleotídeo de fita dupla é referida como a direção 5'. A direção de 5' para 3' de adição dos transcritos de RNA em formação é chamada de direção de transcrição. As regiões da seqüência na fita de DNA apresentando a mesma seqüência que o RNA e que são da extremidade 5' para a extremidade 5' do transcrito de RNA são chamadas de “seqüências a

montante”. As regiões da seqüência da fita de DNA apresentando a mesma seqüência que o RNA e que são da extremidade 3’ para a extremidade 3’ do transcrito de RNA são chamadas de “seqüências a jusante”.

5 Quando aplicado a polipeptídeos, o termo “identidade substancial” significa que duas seqüências de peptídeos, quando idealmente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT utilizando os pesos dos espaços iniciais, compartilham pelo menos 80% de identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 90% de identidade de seqüência, com maior preferência pelo menos 95, 96, 97 ou 98% de identidade de seqüência e com maior preferência pelo menos 99% de identidade de seqüência. Preferivelmente, as posições dos resíduos que não são idênticos diferem por substituições conservativas de aminoácido. Conforme discutido aqui, pequenas variações nas seqüências de aminoácidos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina são contempladas como englobadas pela presente invenção, desde que as variações na seqüência de aminoácidos mantenha pelo menos 75%, com maior preferência pelo menos 80%, 90%, 95% e com maior preferência 99%. Substituições conservativas de aminoácidos são aquelas que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos relacionados por suas cadeias laterais. Aminoácidos codificados geneticamente são em geral divididos em famílias: (1) aminoácidos ácidos (por exemplo, aspartato e glutamato); (2) aminoácidos básicos (por exemplo, lisina, arginina e histidina); (3) aminoácidos não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina e triptofano); e (4) aminoácidos polares não carregados (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina e tirosina). Outras famílias de aminoácidos incluem, mas, sem limitações: serina e treonina são uma família hidroxialifática; asparagina e glutamina são uma família contendo amida; alanina, valina, leucina e isoleucina são uma família alifática;

10
15
20
25
30

fenilalanina, triptofano e tirosina são uma família aromática e cisteína e metionina são uma família contendo enxofre na cadeia lateral. Por exemplo, é razoável se esperar que uma substituição isolada de uma leucina com uma isoleucina ou valina, um aspartato com uma glutamina, uma treonina com uma serina, ou uma substituição semelhante de um aminoácido com um aminoácido estruturalmente próximo não irá apresentar um efeito importante na ligação ou propriedades da molécula resultante, especialmente se a substituição não envolver um aminoácido dentro de um sítio funcional. Grupos de substituição conservativa de aminoácido típicos incluem, mas, sem limitações: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido glutâmico-ácido aspártico, cisteína-metionina e asparagina-glutamina.

Substituições de aminoácido preferidas são aquelas que: (1) reduzem a susceptibilidade a proteólise, (2) reduzem a susceptibilidade a oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para a formação de complexos, (4) alteram as afinidades de ligação e (5) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos. Os análogos podem incluir várias muteínas de uma seqüência outra que não a seqüência de peptídeos de ocorrência natural. Por exemplo, substituições de aminoácidos simples ou múltiplas (preferivelmente substituições conservativas de aminoácidos) podem ser obtidas em uma seqüência de ocorrência natural (preferivelmente na parte do polipeptídeo fora do(s) domínio(s) que forma(m) contatos intermoleculares). Uma substituição conservativa de aminoácidos não pode alterar substancialmente as características estruturais da seqüência parental (por exemplo, uma substituição de aminoácido não deve tender a quebrar a hélice que ocorre na seqüência parental, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracteriza a seqüência parental). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeos reconhecidas na técnica são descritas em *Proteins, Structures and*

Molecular Principles (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden e J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton e colaboradores *Nature* **354**:105 (1991), que são incorporadas aqui como referênc

5 referênc

O termo "análogo" conforme utilizado aqui refere-se a polipeptídeos que são compreendidos de um segmento de pelo menos 25 aminoácidos que apresenta substancial identidade a um parte de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo de ocorrência natural e que apresenta pelo menos uma das atividades do polipeptídeo de ocorrência natural. Tipicamente, os análogos de polipeptídeo compreendem uma substituição conservativa de aminoácido (ou adição ou deleção) em relação à seqüência de ocorrência natural. Os análogos tipicamente apresentam um comprimento de pelo menos 20 aminoácidos, preferivelmente pelo menos 50 aminoácidos ou mais e podem ser freqüentemente tão longos quanto um polipeptídeo de ocorrência natural completo.

10 que apresenta pelo menos uma das atividades do polipeptídeo de ocorrência natural. Tipicamente, os análogos de polipeptídeo compreendem uma substituição conservativa de aminoácido (ou adição ou deleção) em relação à seqüência de ocorrência natural. Os análogos tipicamente apresentam um comprimento de pelo menos 20 aminoácidos, preferivelmente pelo menos 50 aminoácidos ou mais e podem ser freqüentemente tão longos quanto um polipeptídeo de ocorrência natural completo.

15 dos, preferivelmente pelo menos 50 aminoácidos ou mais e podem ser freqüentemente tão longos quanto um polipeptídeo de ocorrência natural completo.

Os análogos de peptídeo são comumente utilizados na indústria farmacêutica como fármacos não peptídicos com propriedades análogas às do peptídeo molde. Estes tipos de composto não peptídico são chamados de "miméticos de peptídeo" ou "peptideomiméticos". Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* **15**:29 (1986); Veber e Freidinger *TINS* p.392 (1985); e Evans e colaboradores *J. Med. Chem.* **30**:1229 (1987), os quais são incorporados aqui como referênc

20 análogas às do peptídeo molde. Estes tipos de composto não peptídico são chamados de "miméticos de peptídeo" ou "peptideomiméticos". Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* **15**:29 (1986); Veber e Freidinger *TINS* p.392 (1985); e Evans e colaboradores *J. Med. Chem.* **30**:1229 (1987), os quais são incorporados aqui como referênc

25 mente desenvolvidos com o auxílio de modelagem molecular por computador. Miméticos de peptídeo que são estruturalmente similares a peptídeos terapeuticamente úteis podem ser utilizados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Em geral, peptideomiméticos são estruturalmente similares a um polipeptídeo paradigma (isto é, um polipeptídeo que apresenta uma propriedade bioquímica ou ativida

30 um polipeptídeo que apresenta uma propriedade bioquímica ou ativida

de farmacológica), tal como um anticorpo humano, mas apresenta uma ou mais ligações peptídicas opcionalmente substituídas por uma ligação selecionada do grupo consistindo em: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis e trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos bem conhecidos na técnica. Substituições sistemáticas de um ou mais aminoácidos de uma seqüência consenso por um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina no lugar de L-lisina) podem ser utilizadas para gerar peptídeos mais estáveis. Adicionalmente, peptídeos restritos compreendendo uma seqüência consenso ou uma variação da seqüência consenso substancialmente idêntica podem ser gerados por métodos conhecidos na técnica (Rizo e Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* **61**:387 (1992), que é incorporada aqui como referência); por exemplo, por adição de resíduos de cisteína internos capazes de formar pontes dissulfeto intra-moleculares que ciclizam o peptídeo.

Terminais amino e carboxi preferidos de fragmentos de análogos ocorrem próximos aos limites dos domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados de seqüência de nucleotídeos e/ou aminoácidos contidos em bancos de dados de seqüências públicos ou privados. Preferivelmente, métodos de comparação por computador são utilizados para identificar motivos de seqüência ou domínios de conformação de proteína previstos que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecidas. Métodos para identificar seqüências de proteína que se dobram em uma estrutura tri-dimensional conhecida são conhecidos (ver Bowie e colaboradores *Science* **253**:164 (1991)). Os especialistas na técnica podem reconhecer motivos de seqüência e conformações estruturais que podem ser utilizados para definir domínios estruturais e funcionais de acordo com a invenção.

O termo "agente de ligação específica" refere-se a uma mole

cula natural ou não natural que se liga especificamente a um alvo. Exemplos de agentes de ligação específica incluem, mas, sem limitações, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e compostos de molécula pequena. Em certas realizações, um agente de ligação
5 específica é um anticorpo. Em certas realizações, um agente de ligação específica é uma região de ligação a um antígeno de um anticorpo.

O termo “agente de ligação específica a EGFr” refere-se a um agente de ligação específica que liga especificamente qualquer parte de um polipeptídeo EGFr. Em certas realizações, um agente de ligação
10 específica a EGFr é um anticorpo que especificamente liga um polipeptídeo EGFr. Em certas realizações, um agente de ligação específica a EGFr é um anticorpo humano que especificamente liga um polipeptídeo EGFr. Em certas realizações, um agente de ligação específica a EGFr é o panitumumab. Em certas realizações, um agente de ligação específica
15 a EGFr é uma região de ligação a antígeno de um anticorpo específico para um polipeptídeo EGFr.

O termo “liga especificamente” refere-se à capacidade de um agente de ligação específica de se ligar a um alvo com maior afinidade que se liga a um não alvo. Em certas realizações, ligação específica
20 refere-se à ligação para um alvo com uma afinidade de pelo menos 10, 50, 100, 250, 500 ou 1000 vezes maior que a afinidade para um não alvo. Em certas realizações, a afinidade é determinada por um ensaio de afinidade ELISA. Em certas realizações, a afinidade é determinada por um ensaio BIAcore. Em certas modalidades, a afinidade é determinada
25 por um método cinético. Em certas realizações, a afinidade é determinada por um método equilíbrio/solução. Em certas modalidades, um anticorpo é considerado como ligando especificamente um antígeno quando a constante de dissociação entre o anticorpo e um ou mais de seus epitopos reconhecidos é $\leq 1 \mu\text{M}$, preferivelmente $\leq 100 \text{ nM}$ e com
30 maior preferência $\leq 10 \text{ nM}$.

“Anticorpos e imunoglobulinas nativas” são usualmente glicoproteínas heterotetrâmicas de cerca de 150000 daltons, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto o número de ligações dissulfeto varia entre as

5 cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve apresenta também pontes dissulfeto espaçadas intercadeia. Cada cadeia pesada apresenta em uma extremidade um domínio variável (VH) seguida de um número de domínios constantes. Cada

10 cadeia leve apresenta 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 da cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácido

15 particulares formem uma interface entre os domínios variáveis das cadeias leve e pesada (Chothia e colaboradores *J. Mol. Biol.* **186**:651 (1985); Novotny e Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **82**:4592 (1985); Chothia e colaboradores, *Nature* **342**:877-883 (1989)).

O termo “anticorpo” refere-se tanto a um anticorpo intacto

20 quanto a um fragmento deste que liga um antígeno que compete com o anticorpo intacto pela ligação específica. “Fragmento deste que liga um antígeno” refere-se a uma parte ou fragmento de uma molécula de anticorpo intacta, onde o fragmento retém a função de ligação a antígeno. Os fragmentos de ligação são produzidos por técnicas de DNA

25 recombinante, ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos, tal como clivagem com papaína. Fragmentos de ligação incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticorpos de cadeia simples (“scFv”), Fd' e Fd. Métodos para a produção dos vários fragmentos a partir de anticorpos monoclonais são bem conhecidos dos especialistas na técnica (ver, por exemplo, Pluckthun, 1992, *Immunol. Rev.*

30

130:151-188). Entende-se que um anticorpo outro que não um anticorpo “bi-específico” ou “bi-funcional” apresenta cada um de seus sítios de ligação idênticos. Um anticorpo inibe substancialmente a adesão de um receptor a um contra-receptor quando um excesso de anticorpo reduz a
5 quantidade de receptor ligado ao contra-receptor em pelo menos cerca de 20%, 40%, 60%, ou 80% e mais usualmente acima de cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% (conforme determinado em um ensaio de ligação competitivo *in vitro*).

Um anticorpo “isolado” é um que foi identificado e separado
10 e/ou recuperado a partir de um componente de seu meio natural. Componentes contaminantes de seu meio natural são materiais que iriam interferir com diagnósticos ou usos terapêuticos para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em modalidades preferidas, o anticorpo será purificado
15 (1) acima de 95% em peso de anticorpo conforme determinado pelo método de Lowry e seqüenciamento dos aminoácidos terminais ou internos pela utilização de um seqüenciador tipo “spinning cup”, ou (2) para uma homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando-se azul de Coomassie ou, preferivelmente,
20 marcação com prata. Um anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes desde que pelo menos um componente do meio natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

25 O termo “variável” refere-se ao fato de certas partes dos domínios variáveis diferirem extensivamente na seqüência entre anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno particular. Entretanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente por todos os domínios variáveis dos anticorpos. É
30 concentrada em três segmentos chamados de regiões determinantes de

complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis dos domínios variáveis tanto na cadeia leve quanto na cadeia pesada. As partes mais altamente conservadas dos domínios variáveis são chamadas de quadro (“framework”) (FR). Os domínios variáveis de cadeias pesadas e leves nativas cada uma compreendendo quatro regiões FR, largamente adotando a configuração em folha β , conectados por três CDRs, que formam uma alça conectando e em alguns casos fazendo parte da, a estrutura em folha β . As CDRs em cada cadeia são mantidos unidos próximos pelas regiões FR e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação a antígeno dos anticorpos (ver Kabat e colaboradores (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, tais como participação do anticorpo na toxidez celular dependente de anticorpo.

“Fv” é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento e ligação a antígeno completo. Em uma espécie de Fv de cadeia dupla, esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação estável não covalente. Numa espécie de Fv de cadeia simples, um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve podem ser ligados covalentemente por um ligante peptídico flexível de tal forma que as cadeias leve e pesada podem se associar em uma estrutura “dimérica” análoga à de uma espécie de Fv de cadeia dupla. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação a antígeno na superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade na ligação a antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável simples (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antígeno) apresenta a capacidade de reconhecer e ligar antígeno, embora com uma afinidade mais baixa que o sítio de ligação completo.

O termo “região hipervariável” quando utilizado aqui refere-se aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são responsáveis pela ligação a antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácido de uma “região determinante de complementaridade” ou “CDR” (por exemplo, os resíduos 24-34 (L1), 50-62 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-55 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat e colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou os resíduos de uma “alça hipervariável” (por exemplo, os resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* **196**:901-917 (1987)). As “regiões de quadro” ou resíduos “FR” são aqueles resíduos de domínio variável outros que não os resíduos de região hipervariável tal como definida aqui.

O termo “regiões determinantes de complementaridade” ou “CDRs”, quando utilizado aqui, refere-se a partes de receptores imunológicos que entram em contato com um ligante específico e determina sua especificidade. As CDRs de receptores imunológicos são a parte mais variável da proteína receptora, conferindo aos receptores sua diversidade e estão contidas em seis alças na extremidade distal dos domínios variáveis do receptor, três alças partindo de cada um dos dois domínios variáveis do receptor.

“Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo” e “ADCC” refere-se a uma reação mediada por célula na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores Fc (FcRs) (por exemplo, células killer naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado em uma célula alvo e subseqüentemente causam a lise da célula alvo. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, enquanto monócitos expressam FcγRI, FcγRII

e FcγRIII. A expressão de Fc em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 à página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* **9**:457-92 (1991). De maneira a se acessar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio ADCC *in vitro*, tal como o descrito na Patente US 5.500.362 ou na Patente US5.821.337, pode ser realizado. Células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células killer naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade ADCC da molécula de interesse pode ser acessada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal tal como descrito em Clynes e colaboradores *PNAS (USA)* **95**:652-656 (1988).

O termo “epitopo” inclui qualquer proteína determinante capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina e/ou a um receptor de célula T. Determinantes epitópicos usualmente consistem em agrupamentos quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais sacarídeas e usualmente apresentam características estruturais em três dimensões, bem como características de carga específica.

O termo “agente” é utilizado aqui para denotar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica, ou um extrato proveniente de materiais biológicos.

Conforme utilizados aqui, os termos “rótulo” ou “rotulado” referem-se à incorporação de um marcador detectável, por exemplo, pela incorporação de um aminoácido radio-rotulado ou ligação a um polipeptídeo ou radicais biotinila que podem ser detectados por avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que possam ser detectados por métodos óticos ou colorimétricos). Em certas situações, o rótulo ou marcador podem ser também terapêuticos. Vários métodos de rotulagem de polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser utilizados. Exemplos de rótulos para polipeptídeos incluem, mas, sem limitações,

os seguintes: radioisótopos ou radionucleotídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), rótulos fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforo lantanídeo) rótulos enzimáticos (peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), grupos quimio-
5 luminescentes, grupos biotinila e epitopos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, seqüências pares de zipper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, tags epitopo). Em algumas realizações, os rótulos são fixados por braços espaçadores de vários
10 comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial.

O termo “agente farmacêutico ou fármaco” conforme utilizado aqui refere-se a um composto químico ou composição química capaz de introduzir um efeito terapêutico desejado quando apropriadamente administrado a um paciente. Outros termos químicos são utilizados
15 aqui de acordo com o uso convencional da técnica, como exemplificado pelo *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)), incorporado aqui como referência.

O termo “agente anti-câncer” é utilizado aqui para se fazer referência a agentes que apresentam a propriedade funcional de inibir o
20 desenvolvimento ou progressão de um neoplasma em um ser humano, particularmente uma lesão maligna (cancerosa), tal como um carcinoma, sarcoma, linfoma, ou leucemia. Inibição de metástase é freqüentemente uma propriedade de agentes anti-câncer.

Conforme utilizado aqui, o termo “substancialmente puro”
25 significa uma espécie e a espécie predominante presente (isto é, em uma base molar é mais abundante que qualquer outra espécie individual na composição) e preferivelmente uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a espécie compreende pelo menos cerca de 50% (em uma base molar) de todas as espécies macromoleculares
30 presentes. Em geral, uma composição substancialmente pura irá

compreender mais de cerca de 80% de todas as espécies macromoleculares presentes na composição, com maior preferência mais de que cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%. Com maior preferência, a espécie é purificada à homogeneidade essencial (espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição por métodos de detecção convencionais) onde a composição consiste essencialmente de uma única espécie macromolecular.

Os termos “paciente” e “indivíduo” incluem indivíduos humanos e animais.

Os termos “mamífero” e “animal” para os propósitos de tratamento referem-se a qualquer animal classificado como mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de criação e animais de zoológico, esportes ou de companhia, tais como cães, cavalos, gatos, vacas etc. Preferivelmente, o mamífero é humano.

O termo “estado doentio” refere-se a um estado fisiológico de uma célula ou de um mamífero total no qual ocorreu uma interrupção, parada ou distúrbio das funções, sistemas celulares ou corporais, ou órgãos.

Os termos “tratar” ou “tratamento” referem-se tanto a tratamento terapêutico quanto profilático ou medidas preventivas, onde o objetivo é prevenir ou desacelerar (reduzir) uma alteração fisiológica ou distúrbio indesejados, tal como o desenvolvimento ou disseminação de câncer. Para os propósitos desta invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas, sem limitações, alívio de sintomas, redução da extensão da doença, estabilização (isto é, não agravamento) do estado da doença, retardo ou redução da progressão da doença, melhora ou palição do estado doentio e remissão (parcial ou total), detectável ou não detectável. “Tratamento” pode também significar o prolongamento da sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada sem tratamento. Os necessitados de tratamento incluem aqueles já com a

condição ou distúrbio, bem como aqueles com tendência a apresentarem a condição ou distúrbio ou aqueles em que a condição ou distúrbio deve ser prevenido.

Uma afirmação de que o tratamento é “eficaz” significa que o
5 tratamento é útil para o tratamento da doença ou condição para a qual o tratamento é administrado.

Um “distúrbio” é qualquer condição que se beneficiaria de um ou mais tratamentos. Isto inclui distúrbios ou doenças crônicas ou agudos incluindo aquelas condições patológicas que predisõem a
10 mamífero ao distúrbio em questão. Exemplos não limitantes de distúrbios a serem tratados aqui incluem tumores benignos e malignos, leucemias e malignidades linfóides, em particular câncer de mama, retal, de ovário, de estômago, endometrial, da glândula salivar, do pulmão, rim, cólon, tireóide, pancreático, da próstata e bexiga. Um
15 distúrbio preferido a ser tratado de acordo com a presente invenção é um tumor maligno, tal como câncer colo-retal, câncer cervical (por exemplo, escamoso intraepitelial cervical e neoplasia glandular), câncer de pulmão, carcinoma de célula renal (RCC), tumores esofágicos, tumores epiteliais malignos e linhagens celulares derivadas de carcinoma.
20 ma.

Uma “doença ou condição relacionada com um polipeptídeo EGFr” inclui pelo menos uma doença ou condição selecionada de: uma doença ou condição causada por um polipeptídeo EGFr; uma doença ou condição exacerbada por um polipeptídeo EGFr; uma doença ou condi-
25 ção para a qual um polipeptídeo EGFr contribui; e uma doença ou condição que está associada com a presença de um polipeptídeo EGFr. Em certas realizações, a doença ou condição relacionada com um polipeptídeo EGFr pode existir na ausência do polipeptídeo EGFr. Em certas realizações, um aumento ou redução da quantidade de polipeptídeo EGFr causa uma doença ou condição relacionada com um polipep-
30 deo EGFr

tídeo EGFr. Em certas realizações, uma doença ou condição relacionada a um polipeptídeo EGFr pode ser exacerbada por um aumento ou redução da quantidade de polipeptídeo EGFr. Em certas realizações, uma doença ou condição relacionada com um polipeptídeo EGFr é um
5 câncer. Um “câncer relacionado com EGFr” inclui pelo menos um câncer selecionado de: um câncer que é provocado por um polipeptídeo EGFr, um câncer que é exacerbado por um polipeptídeo EGFr, um câncer para o qual um polipeptídeo EGFr contribui e um câncer que é associado com um polipeptídeo EGFr. Cânceres relacionados com EGFr
10 típicos incluem, mas, sem limitações, câncer de pulmão (incluindo, mas, sem limitações, carcinoma pulmonar de célula pequena), câncer de mama, câncer renal, câncer do cólon, câncer gástrico, câncer no cérebro, câncer de bexiga, cânceres de cabeça e pescoço, câncer de ovário e câncer da próstata.

15 Em “terapia combinada” ou “terapia por combinação”, os pacientes são tratados com um agente de ligação específica de EGFr em combinação com um agente quimioterápico ou anti-câncer e/ou terapia por radiação. Em certas realizações, um câncer relacionado com EGFr é tratado sob protocolo pela adição de um agente de ligação específica a
20 um polipeptídeo EGFr à linha primária e secundária terapêutica padrão. Em certas realizações, os esquemas de protocolo irão objetivar a efetividade tal como acessada pela redução da massa tumoral bem como a capacidade em reduzir as doses usuais da quimioterapia padrão. Em certas realizações, estas reduções de dosagem irão permitir uma terapia
25 adicional e/ou prolongada pela redução da toxidez relacionada com a dose do agente quimioterapêutico.

“Monoterapia” refere-se ao tratamento de um distúrbio pela administração de um agente de ligação específica a EGFr a pacientes sem um acompanhamento quimioterapêutico ou agente anti-câncer ou
30 terapia com radiação.

Algumas Modalidades Típicas
Alguns Métodos Típicos de Determinação
do Número de Cópias do Gene de EGFr

Em várias realizações, o número de cópias do gene de EGFr
5 de uma amostra pode ser determinado por uma variedade de formas
conhecidas na técnica. Métodos típicos incluem, mas, sem limitações,
ensaios baseados em hibridização, ensaios baseados em amplificação e
por detecção da transcrição genética e expressão de proteína.

Em certas modalidades, um ensaio baseado em hibridização
10 é utilizado para se determinar o número de cópias do gene de EGFr em
uma amostra. Em certas realizações, o ensaio baseado em hibridização
é a hibridização fluorescente *in situ* ("FISH") (ver, por exemplo, Angerer,
Meth. Enzymol. **152**:649 (1987); Pinkel e colaboradores, *Proc. Natl. Acad.*
Sci. U.S.A. **85**:9138-42 (1988)). Em algumas destas modalidades, a
15 amostra é fixada. Em algumas destas realizações, a amostra é tratada
para aumentar a acessibilidade de um ou mais ácidos nucleicos alvo.
Em algumas destas realizações, a amostra é exposta a uma ou mais
sondas que se ligam especificamente ao gene de EGFr. Em certas
realizações, uma ou mais sondas que se ligam especificamente ao gene
20 de EGFr são rotuladas. Em certas modalidades, a amostra é também
exposta a um ou mais sondas que se ligam especificamente a pelo
menos uma seqüência de nucleotídeos de referência. Em certas modali-
dades, uma ou mais sondas que se ligam especificamente a pelo menos
uma seqüência de nucleotídeos de referência, são rotuladas. Em certas
25 realizações, uma ou mais sondas que se ligam especificamente ao gene
de EGFr são rotuladas com um rótulo diferente do rótulo das uma ou
mais sondas que se ligam especificamente a pelo menos uma seqüência
de nucleotídeos de referência. Em certas modalidades, pelo menos uma
seqüência de nucleotídeos de referência está localizada no cromossomo
30 7. Em certas modalidades, duas cópias de pelo menos uma seqüência

de nucleotídeos de referência estão presentes em cada célula na amostra. Em certas realizações, pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência é uma seqüência centromérica. Em certas modalidades, as sondas rotuladas são detectadas por microscopia fluorescente. Em certas realizações, o número de cópias do gene de EGFr é comparado com o número de cópias de pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência. Em certas modalidades, um aumento do número de cópias do gene de EGFr na amostra de teste em relação ao número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência prediz que um tratamento com agente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr no indivíduo.

Em certas modalidades, é determinado o número de núcleos presentes em uma amostra. Em certas realizações, o número de núcleos presentes em uma amostra é determinado por microscopia fluorescente. Em certas modalidades, o número de cópias do gene de EGFr é comparado com o número de núcleos presentes na amostra. Em certas realizações, a razão do número de cópias do gene de EGFr para o número de núcleos espera-se que seja 2 em uma amostra normal. Em certas modalidades, uma razão do número de cópias do gene de EGFr para o número de núcleos maior que dois prediz que um tratamento com uma gente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr em um indivíduo.

Em certas realizações, um ensaio baseado em hibridização é um Southern blot (ver, por exemplo, Sambrook e Russell, "*Southern Hybridization*" em "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 3ª ed., Cold Spring Harbor Lab. Press: Cold Spring Harbor (2001)). Em certas realizações, os ácidos nucléicos da amostra são separados por eletroforese. Em certas modalidades, os ácidos nucléicos separados são transferidos para um suporte sólido. Suportes sólidos típicos incluem, mas, sem limitações, nylon; vidro; quartzo; membranas diazotadas,

incluindo mas, sem limitações, papel ou nylon; silicones; poliformaldeído, celulose; acetato de celulose; plásticos incluindo, mas, sem limitações, polietileno, polipropileno e poliestireno; papel; cerâmicas; metais; metalóides; materiais semicondutores; e substâncias que formam géis, incluindo, mas, sem limitações, gelatinas, lipopolissacarídeos, silicatos, agarose e poliacrilamidas. Em algumas destas modalidades, os ácidos nucleicos separados sobre o suporte sólido são expostos a uma ou mais sondas que se ligam especificamente ao gene de EGFr. Em certas realizações, uma ou mais sondas que se ligam especificamente ao gene de EGFr são rotuladas. Em certas modalidades, os ácidos nucleicos separados sobre o suporte sólido são também expostos a uma ou mais sondas que se ligam especificamente a pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência. Em certas realizações, uma ou mais sondas que se ligam especificamente a pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência são rotuladas. Em certas modalidades, uma ou mais sondas que se ligam especificamente ao gene de EGFr são rotuladas com um rótulo diferente do rótulo das uma ou mais sondas que se ligam especificamente a pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência. Em certas realizações, pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência está localizada no cromossomo 7. Em certas modalidades, duas cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência estão presentes em cada célula na amostra. Em certas realizações, pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência é uma seqüência centromérica. Em certas modalidades, as sondas rotuladas são detectadas. Em certas realizações, o número de cópias do gene de EGFr é comparado com o número de cópias de pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência. Em certas realizações, um aumento no número de cópias do gene de EGFr na amostra de teste em relação ao número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência prediz que um tratamento com um agente de ligação

específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr no indivíduo.

Em certas modalidades, o ensaio baseado em hibridização é um ensaio sandwich (ver, por exemplo, Hames e Higgins, "*Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*", IRL Press (1985); Gall e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **63**: 378-383 (1969); e John e colaboradores, Nature **223**:582-587 (1969)). Em certas modalidades, um ácido nucléico que se liga especificamente ao gene de EGFr é imobilizado em um suporte sólido. Suportes sólidos típicos incluem, mas, sem limitações, nylon; vidro; quartzo; membranas diazotadas, incluindo mas, sem limitações, papel ou nylon; silicones; poliformaldeído, celulose; acetato de celulose; plásticos incluindo, mas, sem limitações, polietileno, polipropileno e poliestireno; papel; cerâmicas; metais; metalóides; materiais semicondutores; e substâncias que formam géis, incluindo, mas, sem limitações, gelatinas, lipopolissacarídeos, silicatos, agarose e poliacrilamidas. Tipos exemplares de imobilização incluem, mas, sem limitações, ligação covalente via um ou mais grupos funcionais, incluindo, mas, sem limitações, ácidos carboxílicos, aldeídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etilênicos, grupos hidroxila e grupos mercapto.

Em certas modalidades, um ácido nucléico imobilizado que se liga especificamente ao gene de EGFr é exposto a ácidos nucléicos de uma amostra. Em certas realizações, um ou mais genes de EGFr se hibridizam ao ácido nucléico imobilizado que se liga especificamente ao gene de EGFr. Em certas modalidades, uma etapa de lavagem remove ácidos nucléicos na amostra não hibridizados e/ou mal hibridizados do ácido nucléico imobilizado. Em certas realizações, o complexo gene de EGFr:ácido nucléico imobilizado é exposto a uma sonda específica para o gene de EGFr. Em certas modalidades, a sonda é rotulada. Em certas realizações, o rótulo é detectável quantitativamente. Em certas modalidades, o número de cópias do gene de EGFr em uma amostra é compa-

rado com número de cópias de pelo menos uma seqüência de referência nesta amostra. Em certas realizações, o número de cópias do gene de EGFr em uma amostra tumorigênica é comparado com o número de cópias do gene de EGFr de uma amostra normal. Em certas modalidades, o número de cópias do gene de EGFr em uma amostra de tumor maligno é comparado com o número de cópias do gene de EGFr de uma amostra normal.

Em certas modalidades, o número de cópias do gene de EGFr de uma amostra é determinado por um ensaio baseado em amplificação. Ensaio baseado em amplificação típicos incluem, mas, sem limitações, PCR quantitativa (ver, por exemplo, Poropat e colaboradores, *Clinical Chem.* **44**:724-730, 1998), reação em cadeia de ligase (ver, por exemplo, Wu e colaboradores, *Genomics* 4:560 (1989); Landegren e colaboradores, *Science* 241:1077 (1988); e Barringer e colaboradores, *Gene* **89**:117 (1990)), amplificação por transcrição (ver, por exemplo, Kwoh e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:1173 (1989)); PCR competitiva (ver, por exemplo, Honda e colaboradores, *J. Exp. Botany* **53**:1515-20 (2002)); e replicação de seqüência auto-sustentada (ver, por exemplo, Guatelli e colaboradores, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:1874 (1990)).

Em certas realizações, o número de cópias do gene de EGFr de uma amostra é determinado pela quantificação de transcritos do gene de EGFr na amostra, utilizando-se qualquer um dos métodos descritos acima.

Em certas modalidades, o número de cópias do gene de EGFr de uma amostra é determinado pela quantificação da expressão do polipeptídeo EGFr, utilizando-se métodos conhecidos na técnica. Métodos de quantificação de polipeptídeo típicos incluem, mas, sem limitações, análise de absorção de luz, incluindo, mas, sem limitações, determinação da absorbância a 280 nm; incubação de extratos da

amostra com anticorpos anti-EGFr seguida da quantificação dos anticorpos anti-EGFr especificamente ligados; e cromatografia, incluindo, mas, sem limitações, eletroforese seguida de densitometria ou análise Western e cromatografia em coluna acoplada a um dispositivo de
5 detecção.

Em certas realizações, um sistema baseado em conjunto é utilizado para a determinação do número de cópias do gene de EGFr da amostra. Sistemas baseados em conjunto incluem, mas, sem limitações, sistemas baseados em conjunto envolvendo ensaios baseados em
10 hibridização, ensaios baseados em amplificação, quantificação da transcrição do gene e quantificação da expressão da proteína. Algumas metodologias de conjunto típicas são descritas abaixo.

Alguns Conjuntos Típicos

Em certas modalidades, o número de cópias do gene de EGFr em uma amostra de um ou mais indivíduos é determinado utilizando-se tecnologia de micro-conjunto, como conhecido na técnica (ver, por exemplo, Pollack e colaboradores, *Nature Genetics* **23**: 41-46 (1999); Pastinen, *Genome Res.* **7**:606-614 (1997); Jackson, *Nature Biotechnology* **14**:1685 (1996); Chee, *Science* **274**: 610 (1995); e Pinkel e colaboradores, *Nature Genetics* **20**:207-211 (1998)). Em certas realizações, o
20 número de cópias do gene de EGFr em duas ou mais amostras de um ou mais indivíduos é determinado utilizando-se tecnologia de micro-conjunto. Em algumas destas modalidades, duas ou mais amostras são coletadas de um único indivíduo. Em algumas destas realizações, uma
25 de duas ou mais amostras é de um tumor relacionado com EGFr e uma outra de duas ou mais amostras é de um tecido normal não tumorigênico.

Em certas modalidades, uma amostra não é tratada antes da determinação do número de cópias do gene de EGFr. Em certas
30 realizações, uma amostra é tratada antes da determinação do número

de cópias do gene de EGFr. Em certas realizações, o número de cópias do gene de EGFr em uma amostra é determinado tanto antes quanto depois do tratamento da amostra.

Em certas modalidades, são providos micro-conjuntos compreendendo uma ou mais moléculas que se ligam especificamente a um gene de EGFr. Em certas realizações, são providos micro-conjuntos compreendendo uma ou mais ácidos nucléicos complementares a um gene de EGFr. Em certas modalidades, os ácidos nucléicos são extraídos de uma ou mais amostras de um ou mais indivíduos e os ácidos nucléicos extraídos são expostos a um ou mais ácidos nucléicos complementares a um gene de EGFr no micro-conjunto para formar um complexo de hibridização do gene de EGFr. Em algumas destas modalidades, a quantidade do complexo de hibridização do gene de EGFr em um micro-conjunto é determinada. Em algumas destas realizações, a quantificação é por ligação de uma molécula rotulada a um complexo de hibridização do gene de EGFr e detecção quantitativa do rótulo. Em algumas destas modalidades, o gene de EGFr é rotulado e quantitativamente detectado após a formação do complexo de hibridização do gene de EGFr.

Em certas modalidades, um tratamento candidato para um câncer relacionado com EGFr é selecionado utilizando-se tecnologia de micro-conjunto. Em algumas destas realizações, o número de cópias do gene de EGFr é determinado em uma primeira amostra obtida de um paciente antes da administração do tratamento ao paciente e o número de cópias do gene de EGFr é determinado em uma segunda amostra obtida do paciente no momento após a administração do tratamento. Em algumas destas modalidades, o número de cópias do gene de EGFr da primeira amostra e o da segunda amostra são comparados, onde uma redução do número de cópias do gene de EGFr na segunda amostra em relação ao número de cópias do gene de EGFr da primeira

amostra indica que o tratamento é efetivo para o paciente.

Em certas modalidades, a presença ou ausência de um ou mais polipeptídeos EGFr em uma ou mais amostras é acessada utilizando-se tecnologia de micro-conjunto. Em algumas destas realizações, o mRNA é primeiro extraído de uma amostra de célula ou tecido e é subseqüentemente convertido a cDNA, que é hibridizado ao micro-conjunto. Em algumas destas modalidades, a presença ou ausência de cDNA que é especificamente ligado ao micro-conjunto é indicativa da presença ou ausência do polipeptídeo EGFr. Em algumas destas modalidades, o nível de expressão de um ou mais polipeptídeos EGFr é acessado pela quantificação do cDNA que está especificamente ligado ao micro-conjunto. Em algumas destas realizações, a célula ou tecido são tratados antes do acesso e a capacidade do tratamento em afetar a expressão dos um ou mais polipeptídeos EGFr é também acessada.

Em certas realizações, são providos micro-conjuntos compreendendo um ou mais polipeptídeos EGFr (ver, por exemplo, McBeath e colaboradores, *Science*, **289**:1760-1763, 2000). Em certas realizações, agentes de ligação específica a um ou mais polipeptídeos EGFr candidatos são selecionados utilizando-se um micro-conjunto de polipeptídeo EGFr. Em certas modalidades, são providos micro-conjuntos compreendendo um ou mais agentes de ligação específica a um polipeptídeo EGFr. Em certas realizações, a quantidade de um polipeptídeo EGFr em uma ou mais amostras é acessada.

Alguns Agentes de Ligação Específica e Anticorpos

Em certas realizações, um agente de ligação específica a EGFr é provido. Em algumas destas realizações, o agente de ligação específica a EGFr é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno deste.

Em certas modalidades, anticorpos monoclonais podem ser obtidos utilizando-se o método de hibridoma primeiro descrito por

Kohler e colaboradores, *Nature* **256**:495 (1975). Em certas realizações, anticorpos monoclonais podem ser obtidos por métodos de DNA recombinante (Patente US4.816.567).

Em certas modalidades do método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, incluindo, mas, sem limitações, um hamster ou macaco, é imunizado para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que irão se ligar especificamente à proteína utilizada para a imunização. Em certas realizações, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Em certas realizações, os linfócitos ou linfócitos enriquecidos para células B são fundidos com células de mieloma por um processo de fusão de eletro-célula ou pela utilização de um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, Academic Press, (1996)).

Em certas modalidades, as células de hibridoma são semeadas e crescidas num meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Em certas realizações, se as células de mieloma parentais não contêm a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente irão incluir hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias estas que inibem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

Em certas modalidades, são selecionadas células de mieloma que se fundem eficientemente, suportam produção em nível alto estável de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo selecionadas e são sensíveis a um meio tal como o meio HAT. Linhagens de células de mieloma típicas incluem, mas, sem limitações, linhagens de mieloma de murino, tais como as derivadas de tumores de camundongo MOP-21

e MC-11 disponibilizadas pelo Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia EUA e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponibilizadas pela American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA. Em certas modalidades, são utilizadas linhagens de célula de mieloma humano e/ou heteromieloma camundongo-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.* **133**:3001 (1984); Brodeur e colaboradores, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)).

Em certas realizações, o meio de cultura no qual as células de hibridoma são crescidas é ensaiado para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Em certas modalidades, a especificidade da ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imuno-precipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*. Ensaio de ligação típicos incluem, mas, sem limitações, um radioimunoensaio (RIA), um ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) e uma análise de Scatchard de Munson e colaboradores, *Anal. Biochem.* **107**:220 (1980).

Em certas modalidades, após terem sido identificadas as células de hibridoma produtoras de anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, as células podem ser sub-clonadas por procedimentos de limitação por diluição e crescidas por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, Academic Press, 1996). Meios de cultura típicos para este propósito incluem, mas, sem limitações, os meios DMEM e RPMI-1640. Em certas realizações, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores ascites em um animal.

Em certas realizações, os anticorpos monoclonais secretados pelos sub- clones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido ascite, ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, proteína A-sefarose, cromatografia

tografia em hidroxiapatita, eletroforese em gel, diálise, ou cromatografia por afinidade.

Em certas realizações, um ácido nucléico que codifica os anticorpos monoclonais é isolado e seqüenciado utilizando-se procedimentos convencionais (por exemplo, pela utilização de sondas de oligonucleotídeo capazes de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias leve e pesada dos anticorpos monoclonais). Em certas modalidades, as células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal ácido nucléico. Em certas realizações, o polinucleotídeo isolado pode ser colocado em vetores de expressão. Em algumas destas modalidades, os vetores de expressão são transfectados em células hospedeiras para se obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Células hospedeiras típicas incluem, mas, sem limitações, células de *E. coli*, células CÓS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outra forma não produzem imunoglobulina. Em certas realizações, o ácido nucléico pode ser modificado, por exemplo, por união covalente à seqüência de codificação da imunoglobulina toda ou parte da seqüência de codificação de um polipeptídeo não imunoglobulina, criando um anticorpo “quimérico” ou “híbrido”.

Em certas realizações, os polipeptídeos não imunoglobulina são substituídos para os domínios constantes de um anticorpo. Em certas realizações, os polipeptídeos não imunoglobulina são substituídos para os domínios variáveis de sítios de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um sítio de combinação a antígeno apresentando especificidade para um antígeno alvo e um outro sítio de combinação a antígeno apresentando especificidade para um antígeno diferente.

Em certas, os anticorpos quiméricos ou híbridos podem ser preparados *in vitro* utilizando-se métodos conhecidos na química de

proteína sintética, incluindo mas, sem limitações, as envolvendo agentes de reticulação. Em certas realizações, podem ser construídas imunotoxinas utilizando-se uma reação de troca de dissulfeto ou pela formação de uma ligação tioéter. Reagentes típicos para este propósito incluem, 5 mas, sem limitações, iminotiolato e metil-4-mercaptobutiri-midato.

Em certas modalidades, são providos anticorpos humanos para um antígeno alvo. Em certas realizações, a tecnologia de hibridoma é estendida para criar anticorpos humanos utilizando-se heteromielomas (mielomas híbridos camundongo x humano) como pares de fusão 10 (ver, por exemplo, Kozbor, *J. Immunol.* **133**: 3001 (1984); Brodeur e colaboradores, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987). Em certas realizações, células que secretam anticorpo humano podem ser imortalizadas por infecção com um vírus de Epstein-Barr (EBV) (James e Bell, *J. Immunol. Methods* **100**:5-40 (1987)). Em certas modalidades, a imortalidade de células B humanas pode obtida pela introdução de uma combinação definida de genes transformantes (Hahn e colaboradores, *Nature* **400**: 464-468 (1999)). 15

Em certas modalidades, animais transgênicos que são capazes, por imunização, de produzir um repertório de anticorpos humanos 20 na ausência da produção de imunoglobulina endógena são utilizados para produzir anticorpos humanos (ver, por exemplo, Jakobovits e colaboradores, *Nature* **362**:255-258 (1993); Lonberg e Huszar, *Int. Rev. Immunol.* **13**:65-93 (1995); Fishwild e colaboradores, *Nat. Biotechnol.* **14**:845-851 [1996]; Mendez *et al*, *Nat. Genet.* **15**:146-156 [1997]; Green, *J. Immunol. Methods* **231**:11-23 (1999); Tomizuka e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:722-727 (2000); revisto em Little e colaboradores, *Immunol. Today* **21**:364-370 (2000)). Foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união da cadeia pesada do anticorpo 25 (J_H) em linhagens quiméricas ou germinais de camundongos mutantes 30

resulta na inibição completa da produção de anticorpo endógeno (Jakobovits e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2551-2555 (1993)). A transferência do conjunto genético da imunoglobulina de linhagem germinal humana em tal linhagem germinal de camundongos mutantes resulta na produção de anticorpos humanos por desafio com antígeno (Jakobovits e colaboradores, *Nature* **362**:255-258 (1993)).

Mendez e colaboradores (*Nature Genetics* **15**:146-156 (1997)) geraram uma linhagem de camundongos transgênicos designados por "Xenomouse®II" que, quando desafiados com um antígeno, geram anticorpos humanos totais de alta afinidade. Isto foi obtido pela integração de linhagem germinal de locais de cadeia pesada e cadeia leve humana megabase em camundongos com deleção no segmento J_H endógeno. O Xenomouse® II ancora 1020 kb de local de cadeia pesada humana contendo aproximadamente 66 genes V_H , regiões D_H e J_H completas e três diferentes regiões constantes (μ , δ e γ) e ancora também 800 kb do local κ humano contendo 32 genes V_κ , segmentos J_κ e genes C_κ . Em certas realizações, os anticorpos produzidos nestes camundongos se assemelham muito àqueles observados em humanos em todos os aspectos, incluindo rearranjo genético, montagem e repertório genéticos. Em certas realizações, os anticorpos humanos são preferivelmente expressos em anticorpos endógenos devido à deleção no segmento J_H endógeno que evita o rearranjo genético no local murino.

Em certas realizações, um animal transgênico compreende genes de imunoglobulina humana (por exemplo, o Xenomouse® II (Abgenix, Inc.)) pode ser imunizado com um antígeno de interesse particular, tal como um polipeptídeo EGFr. Em certas realizações, soros destes animais imunizados são varridos para a reatividade do anticorpo contra o antígeno inicial. Em certas modalidades, são isolados linfócitos dos nódulos linfáticos ou células de baço e podem ser enriquecidos adicionalmente para células B por seleção para células CD136 negativas

e CD19+. Em certas realizações, estas culturas de célula B (BCCs) são fundidas a células de mieloma para gerar hibridomas conforme detalhado acima. Em certas modalidades, estas culturas de célula B são varridas adicionalmente para reatividade contra o antígeno inicial. Tal varredura inclui, mas não se limita a, ELISA, um ensaio de competição com anticorpos conhecidos que ligam o antígeno de interesse e ligação *in vitro* a células CHO transfectadas de forma transiente que expressam o antígeno. Em certas realizações, células B únicas que secretam anticorpos de interesse são identificadas por um ensaio de placa hemolítica específico. Em algumas destas modalidades, as células alvo para lise são células de sangue vermelho de ovelha (SRBCs) revestidas com o antígeno. Em algumas destas realizações, a formação de um placa indica lise mediada por antígeno específico das células alvo, e, desta forma, a presença de uma cultura de célula B secretando a imunoglobulina de interesse e complemento. Em algumas destas modalidades, a célula plasmática específica para antígeno único no centro da placa pode ser isolada e utilizado para isolamento de mRNA.

Em certas realizações, o ácido nucléico que codifica a região variável do anticorpo secretado pode ser clonado utilizando-se PCR de transcriptase reversa. Em certas modalidades, o ácido nucléico clonado é posteriormente inserido em um vetor de expressão adequado, tal como um cassete vetor tal como um vetor pcDNA ou vetor pcDNA contendo os domínios constantes das cadeias pesada e leve da imunoglobulina. Em certas modalidades, o vetor gerado é transfectado em células hospedeiras (isto é, células CHO) e cultivado em meio nutriente convencional modificado conforme apropriado para induzir promotores, transformantes de seleção, ou amplificação de genes que codificam as seqüências desejadas.

Em certas realizações, tecnologia de apresentação de fago é utilizada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo

in vitro, a partir de repertórios de gene do domínio variável (V) de imunoglobulina a partir de doadores não imunizados (ver, por exemplo, McCafferty e colaboradores, *Nature* **348**:552-553 (1990); revisto em Kipriyanov e Little, *Mol. Biotechnol.* **12**:173-201 (1999); Hoogenboom e Chames, *Immunol. Today* **21**:371-378 (2000)). Em algumas destas realizações, os genes do domínio V do anticorpo são clonados “*in-frame*” ou em um gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd e apresentados como fragmentos funcionais na superfície da partícula do fago. Em certas realizações, a partícula filamentososa contém uma cópia de DNA de fita simples do genoma do fago e seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo resultam também na seleção do gene que codifica o anticorpo que exibe estas propriedades. A apresentação de fago pode ser realizada em uma variedade de formatos, incluindo, mas, sem limitações, aqueles identificados nos seguintes documentos: Johnson e Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* **3**:564-571 (1993); Winter e colaboradores, *Annu. Rev. Immunol.* **12**:433-455 (1994); Dall’Acqua e Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:443-450 (1998); e Hoogenboom e Chames, *Immunol. Today* **21**:371-378 (2000). Fontes de segmentos do gene V para a apresentação de fago incluem, mas, sem limitações, uma biblioteca combinatória randômica pequena de genes V derivados de baços de camundongos imunizados (Clackson e colaboradores, *Nature* **352**:624-628 (1991)) e um repertório de genes V de doadores humanos não imunizados (Marks e colaboradores, *J. Mol. Biol.* **222**:581-597 (1991), ou Griffiths e colaboradores, *EMBO J.* **12**:725-734 (1993)).

Em certas modalidades, em uma resposta imunológica natural, os genes de anticorpo acumulam mutações em um alto grau (hipermutação somática). Em certas realizações, algumas das alterações introduzidas conferem maior afinidade. Em certas modalidades, as

células B mostrando imunoglobulina de superfície de alta afinidade são preferivelmente replicadas e diferenciadas durante o desafio por antígeno subsequente. Em certas modalidades, este processo natural pode ser mimetizado pelo emprego da técnica conhecida como “mistura de cadeia” (“chain shuffling”) (Marks e colaboradores, *Bio/Technol.* **10**:779-783 (1992)). Em algumas destas realizações, a afinidade dos anticorpos humanos “primários” obtidos por apresentação de fago pode ser aumentada pela substituição seqüencial dos genes da região V das cadeias leve e pesada com repertórios de variantes de ocorrência natural (repertórios de genes do domínio V obtidos de doadores não imunizados, permitindo a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpo com afinidades na faixa de nM. Em certas realizações, um repertório de anticorpo de fago muito amplo é construído (também conhecido como “a mãe de todas as bibliotecas”), conforme descrito por Waterhouse e colaboradores, *Nucl. Acids Res.* **21**:2265-2266 (1993). Em certas realizações, um anticorpo humano de alta afinidade é diretamente isolado de uma biblioteca de fago ampla (ver, por exemplo, Griffiths e colaboradores, *EMBO J.* **13**:3245-3260 (1994)). Em certas realizações, a mistura (“shuffling”) de genes pode ser utilizada para derivar anticorpos humanos a partir de anticorpos de roedores, onde o anticorpo humano apresenta afinidades e especificidades similares ao anticorpo de roedor de partida. Em algumas destas realizações, o gene do domínio V de cadeia pesada ou de cadeia leve de anticorpos de roedor obtido pela técnica de apresentação de fago com um repertório de genes do domínio V humano, criando quimeras roedor-humano (também chamada de “estampagem de epitopo”). Em certas modalidades, a seleção de regiões variáveis pelos resultados de antígeno no isolamento de regiões variáveis humanas capazes de restaurar um sítio de ligação a antígeno funcional, isto é, o epitopo governa a escolha do par. Em certas realizações, quando o processo é repetido de maneira a substituir o domínio V de roedor

remanescente, um anticorpo humano é obtido o qual não contém nenhum quadro ou resíduo CDR originária de roedor (ver, por exemplo, pedido de patente PCT WO 93/06213).

Alguns Tratamentos Típicos

5 Em certas modalidades, agente de ligação específica anti-EGFr podem apresentar uso terapêutico pela inclusão em um tratamento com agente de ligação específica a EGFr. Neste Relatório, quando da discussão da utilização de agentes de ligação específica a EGFr para tratar doenças ou condições, tal utilização pode incluir agentes de
10 ligação específica a EGFr em si; composições compreendendo agentes de ligação específica a EGFr; e/ou terapias por combinação compreendendo agentes de ligação específica a EGFr e um ou mais ingredientes ativos. Quando agentes de ligação específica a EGFr são utilizados para “tratar” uma doença ou condição, tal tratamento pode ou não incluir a
15 prevenção da doença ou condição. Em certas modalidades, os agentes de ligação específica a EGFr podem bloquear a interação do receptor de EGF com seu ligante, EGF. Em certas realizações, os agentes de ligação específica a EGFr podem ativar o receptor de EGF. Em certas realizações, os agentes de ligação específica a EGFr podem ativar constitutivamente o receptor de EGF. Em certas modalidades, os agentes de ligação
20 específica a EGFr podem bloquear a ativação do receptor de EGF. Em certas realizações, os agentes de ligação específica a EGFr podem bloquear constitutivamente a ativação do receptor de EGF.

 Em certas realizações, um agente de ligação específica a
25 EGFr é administrado sozinho. Em certas modalidades, o agente de ligação específica a EGFr é administrado antes da administração de pelo menos um outro agente terapêutico. Em certas realizações, um agente de ligação específica a EGFr é administrado concorrente à administração de pelo menos um outro agente terapêutico. Em certas modalidades,
30 um agente de ligação específica a EGFr é administrado subsequente à

administração de pelo menos um outro agente terapêutico. Agentes terapêuticos típicos incluem, mas, sem limitações, pelo menos um outro agente para terapia de câncer. Agentes de terapia de câncer típicos incluem, mas, sem limitações, terapia por radiação e quimioterapia.

5 Em certas realizações, as composições farmacêuticas de agente de ligação específica a EGFr podem ser administradas em terapia por combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Em certas modalidades, a terapia por combinação compreende um agente de ligação específica a EGFr em combinação com pelo menos um agente
10 anti-angiogênico. Agentes típicos incluem, mas, sem limitações, composições químicas preparadas sinteticamente, anticorpos, regiões de ligação a antígeno, radionuclídeos e combinações e conjugados destes. Em certas modalidades, um agente pode agir como agonista, antagonista, modulador alostérico, ou toxina. Em certas realizações, um agente
15 pode agir no sentido a inibir ou estimular seu alvo (por exemplo, receptor ou enzima de ativação ou inibição), e, desta forma, promover a morte celular ou interrupção do crescimento celular.

Tratamentos quimioterápicos típicos incluem, mas, sem limitações, agentes anti-câncer incluindo, mas, sem limitações, agentes
20 alquilantes incluindo, mas, sem limitações, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan e clorambucil; nitrosuréias, incluindo, mas, sem limitações, carmustina BCNU, lomustina, CCNU e semustina, metil-CCNU; Temodal™, temozolamida; etileniminas/metil-melamina, incluindo, mas, sem limitações, trietilenomelamina (TEM), metileno,
25 tiofosforamida, tiotepa, hexametilmelamina (HMM) e altretamina; sulfonatos de alquila, incluindo, mas, sem limitações, busulfan; triazinas, incluindo, mas, sem limitações, dacarbazina (DTIC); antimetabólitos, incluindo, mas, sem limitações, análogos de ácido fólico tais como metotrexato e trimetrexato; análogos de pirimidina, incluindo, mas, sem
30 limitações, 5-fluoruracil (5FU), fluordesoxiuridina, gemcitabina, citosina

arabinosídeo (AraC, citarabina), 5-azacitidina e 2,2'-difluordesoxicitidina; análogos de purina, incluindo, mas, sem limitações, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina, cladribina e 2-
5 clorodesoxiadenosina (2- CdA); produtos naturais incluindo, mas, sem limitações, fármacos antibióticos tais como paclitaxel; alcalóides vinca, incluindo, mas, sem limitações, vinblastina (VLB), vincristina e vinorelbina; taxotere; estramustina e fosfato de estramustina; pipodofilotoxinas, incluindo, mas, sem limitações, etoposídeo e teniposídeo; antibióticos,
10 cos, incluindo, mas, sem limitações, actinomicina D, daunomicina, rubidomicina, doxorubicina, mitoxantrona, idarrubicina, bleomicinas, plicamicina, mitramicina, mitomicina C e actinomicina; enzimas, incluindo, mas, sem limitações, L-asparaginase; modificadores de resposta biológica, incluindo, mas, sem limitações, interferon-alfa, IL-2,
15 G-CSF e GM-CSF; doxiciclina; hidrocloreto de irinotecan; agentes diversos, incluindo, mas, sem limitações, complexos de coordenação com platina tais como cisplatina e carboplatina; antracenedionas incluindo, mas, sem limitações, mitoxantrona; uréia substituída, incluindo, mas, sem limitações, hidroxauréia; derivados de metilhidrazina,
20 na, incluindo, mas, sem limitações, N-metilhidrazina (MIH) e procarbazona; supressores adrenocorticais, incluindo, mas, sem limitações, mitotano (o,p'-DDD) e aminoglutetimida; hormônios e antagonistas, incluindo, mas, sem limitações, antagonistas adrenocorticosteróides tais como prednisona e equivalentes, dexametasona e aminoglutetimida;
25 Gemzar™, gemcitabina; progestina, incluindo, mas, sem limitações, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona e acetato de megestrol; estrogênio, incluindo, mas, sem limitações, dietilestilbestrol e equivalentes a etinil estradiol; antiestrogênio, incluindo, mas, sem limitações, tamoxifeno; androgênios, incluindo, mas, sem
30 limitações, propionato de testosterona e fluoximesterona/equivalentes;

antiandrogênicos, incluindo, mas, sem limitações, flutamida, análogos do hormônio de liberação de gonadotropina e leuprolida; oxaliplatina, Eloxatin®, capecitabina, Xeloda®, pemetrexed, Alimta®, letrozol, Femara®, anastrozol, Arimidex® e antiandrogênicos não esteroidais, incluindo,
5 mas, sem limitações, flutamida.

Terapias de câncer típicas, que podem ser administradas com um agente de ligação específica a EGFr, incluem, mas, sem limitações, terapias orientadas. Exemplos de terapias orientadas incluem mas, sem limitações, a utilização de anticorpos terapêuticos. Anticorpos
10 terapêuticos típicos incluem, mas, sem limitações, anticorpos de camundongo, quiméricos camundongo-humano, enxertados com CDR, humanizados e humanos e anticorpos sintéticos, incluindo, mas, sem limitações, os selecionados por varredura de bibliotecas de anticorpo. Anticorpos típicos incluem, mas, sem limitações, aqueles que se ligam a
15 proteínas de superfície celular Her2, CDC20, CDC33 e glicoproteína semelhante a mucina e opcionalmente induzem um efeito citostático e/ou citotóxico nas células tumorais que contêm estas proteínas. Anticorpos típicos incluem, mas, sem limitações, HERCEPTIN™, trastuzumab, que podem ser utilizados para tratar câncer de mama e outras
20 formas de câncer; RITUXAN™, rituximab, ZEVALIN™, ibritumomab, tiuxetano e LYMPHOCIDE™, epratuzumab, que podem ser utilizados para tratar linfoma não de Hodgkin e outras formas de câncer; GLEEVEC™, mesilato de imatinib, que podem ser utilizados para tratar leucemia mielóide crônica e tumores estromais; e BEXXAR™, tositumomab iodo 131, que podem ser utilizados para o tratamento de linfoma
25 não de Hodgkin. Alguns anticorpos típicos incluem também ERBITUX™; IMC-C225; Iressa™; gefitinib; TARCEVA™, ertinolib; inibidores do KDR (receptor do domínio de quinase); anticorpos anti VEGF e antagonistas (por exemplo, Avastin™ e VEGAF-TRAP); anticorpos do
30 receptor anti VEGF e regiões de ligação a antígeno; anticorpos anti-Ang-

1 e Ang-2 e regiões de ligação a antígeno; anticorpos para Tie-2 e outros receptores Ang-1 e Ang-2; ligantes de Tie-2; anticorpos contra inibidores de Tie-2 quinase; e Campath®, alemtuzumab. Em certas realizações, os agentes de terapia de câncer são outros polipeptídeos que induzem seletivamente a apoptose em células tumorais, incluindo, mas, sem limitações, polipeptídeos relacionados com TNF tais como TRAIL.

Em certas modalidades, os agentes de terapia de câncer são agentes anti-angiogênicos que reduzem a angiogênese. Alguns destes agentes incluem, mas, sem limitações, ERBITUX™, IMC-C225; agentes inibidores de KDR (receptor do domínio de quinase) (por exemplo, anticorpos e regiões de ligação a antígeno que se ligam especificamente ao receptor do domínio de quinase); agentes anti-VEGF (por exemplo, anticorpos ou regiões de ligação a antígeno que se ligam especificamente a VEGF, ou receptores solúveis de VEGF ou uma região de ligação a ligante destes) tais como AVASTIN™ ou VEGF-TRAP™; agentes do receptor anti-VEGF (por exemplo, anticorpos ou regiões de ligação a antígeno que se ligam especificamente a estes); agentes inibidores de EGFR tais como IRESSA™, gefitinib, TARCEVA™, erlotinib, agentes anti-Ang1 e anti-Ang2 (por exemplo, anticorpos ou regiões de ligação a antígeno que se ligam especificamente a estes ou a seus receptores, por exemplo, Tie2/Tek); e agentes inibidores anti-Tie-2 quinase (por exemplo, anticorpos ou regiões de ligação a antígeno que se ligam especificamente a estes). Em certas modalidades, as composições farmacêuticas podem incluir também um ou mais agentes (por exemplo, anticorpos, regiões de ligação a antígeno, ou receptores solúveis) que especificamente ligam e inibem a atividade de fatores de crescimento, tais como antagonistas do fator de crescimento hepatócito (HGF, também conhecido como Fator de Scatter) e anticorpos ou regiões de ligação a antígeno que ligam especificamente seu receptor “c-met”.

Os agentes anti-angiogênicos típicos incluem, mas, sem li-

mitações, Campath, IL-8, B-FGF, antagonistas de Tek (Ceretti e colaboradores, publicação do pedido de patente US nº 2003/0162712; Patente US6.413.932); agentes anti-TWEAK (por exemplo, anticorpos de ligação específicas ou regiões de ligação a antígeno, ou antagonistas do receptor de TWEAK solúvel; ver, por exemplo, Wiley, Patente US6.727.225); domínio da desintegrina ADAM para antagonizar a ligação de integrina a seus ligantes (Fanslow e colaboradores, publicação do pedido de patente US 2002/0042368); anticorpos que ligam especificamente o receptor anti-eph e/ou anti-ephrin ou regiões de ligação a antígeno (Patentes US 5.981.245, 5.728.813, 5.969.110, 6.596.852, 6.232.447, 6.057.124 e membros da família destas); antagonistas anti-PDGF-BB (por exemplo, anticorpos de ligação específica ou regiões de ligação a antígeno) bem como anticorpos ou regiões de ligação a antígeno que se ligam especificamente a ligantes de PDGF-BB e agentes inibidores de PDGFR quinase (por exemplo, anticorpos ou regiões de ligação a antígeno que se ligam especificamente a estes).

Os agentes anti-angiogênicos/anti-tumorais incluem, mas, sem limitações, SF-7784 (Pfizer, EUA); cilengtide (Merck KgaA, Alemanha, EPO 770622); pegaptanib octasódico (Gilead Sciences, EUA); Alphastatin (BioActa, UK); M-PGA (Celgene, EUA, Patente US 5.712.291); ilomastat (Arriva, EUA, Patente US 5.892.112); emaxanib (Pfizer, EUA, Patente US 5.792.783); vatalanib (Novartis, Suíça); 2-metoxiestradiol (EntreMed, EUA); TLC ELL-12 (Elan, Irlanda); acetato de anecortave (Alcon, EUA); alfa-D148 Mab (Amgen, EUA); CEP-7055 (Cephalon, EUA); anti-Vn Mab (Crucell, Holanda); DAC:antiangiogênico (ConjuChem, Canadá); Angiocidina (InKine Pharmaceutical, EUA); KM-2550 (Kyowa Hakko, Japão); SU-0879 (Pfizer, EUA); CGP-79787 (Novartis, Suíça, EP 970070); tecnologia ARGENT (Ariad, EUA); YIGSR-Strealth (Johnson & Johnson, EUA); fragmento do fibrinogênio E (BioActa, UK); inibidor de angiogênese (Trigen, UK); TBC-1635 (Encysive Pharmaceuti-

cals, EUA); SC-236 (Pfizer, EUA); ABT-567 (Abbott, EUA); Metastatina (EntreMed, EUA); inibidor de angiogênese (Tripep, Suécia); maspin (Sosei, Japão); 2-metoxiestradiol (Oncology Sciences Corporation, EUA); ER-68203-00 (IVAX, EUA); Benefin (Lane Labs, EUA); Tz-93 (Tsumura, Japão); TAN-1120 (Takeda, Japão); FR-111142 (Fujisawa, Japão, JP 02233610); fator 4 de plaqueta (RepliGen, EUA, EP 407122); antagonista do fator de crescimento endotelial vascular (Borean, Dinamarca); temsirolimus (CCI-779) (University of South Carolina, EUA); bevacizumab (pINN) (Genentech, EUA); inibidores de angiogênese (SUGEN, EUA); XL 784 (Exelixis, EUA); XL 647 (Exelixis, EUA); Mab, integrina alfa5beta3, Vitaxin e Vitaxin de segunda geração (Applied Molecular Evolution, EUA e MedImmune EUA); terapia do gene Retinostat® (Oxford BioMedica, UK); hidrocloreto de enzastaurin (USAN) (Lilly, EUA); CEP 7055 (Cephalon, EUA e Sanofi-Synthelabo, França); BC 1 (Genoa Institute of Cancer Research, Itália); inibidor de angiogênese (Alchemia, Austrália); antagonista de VEGF (Regeneron, EUA); rBPI 21 e derivado antiangiogênico de BPI (XOMA, EUA); PI 88 (Progen, Austrália); cilengitídeo (pINN) (Merck KgaA, Alemanha; Munich Technical University, Alemanha; Scripps Clinic e Research Foundation, EUA); cetuximab (INN) (Aventis, França); AVE 8062 (Ajinomoto, Japão); AS 1404 (Cancer Research Laboratory, Nova Zelândia); SG 292 (Telios, EUA); Endostatina (Boston Children's Hospital, EUA); 2-metoxiestradiol (Boston Children's Hospital, EUA); ZD 6474 (AstraZeneca, UK); ZD 6126 (Angiogene Pharmaceuticals, UK); PPI 2458 (Praecis, EUA); AZD 9935 (AstraZeneca, UK); AZD 2171 (AstraZeneca, UK); vatalanib (pINN) (Novartis, Suíça e Schering AG, Alemanha); inibidores da rota do fator de tecido (EntreMed, EUA); pegaptanib (Pinn) (Gilead Sciences, EUA); xanthorrhizol (Yonsei University, Coréia do Sul); vacina, com base genética, de VEGF-2 (Scripps Clinic e Research Foundation, EUA); SPV5.2 (Supratek, Canadá); SDX 103 (University of California em San Diego, EUA); PX 478

(Pro1X, EUA); Metastatina (EntreMed, EUA); troponina I (Harvard University, EUA); SU 6668 (SUGEN, EUA); OXI 4503 (OXIGENE, EUA); o-guanidinas (Dimensional Pharmaceuticals, EUA); motuporamina C (British Columbia University, Canadá); CDP 791 (Celltech Group, UK);
5 atiprimod (pINN) (GlaxoSmithKline, UK); E 7820 (Eisai, Japão); CYC 381 (Harvard University, EUA); AE 941 (Aeterna, Canadá); vacina contra câncer de FGF2 (EntreMed, EUA); inibidor do ativador de plasminogênio uroquinase (Dendreon, EUA); oglufanide (pINN) (Melmotte, EUA); inibidores de HIF-1alfa (Xenova, UK); CEP 5214 (Cephalon, EUA); BAY
10 RES 2622 (Bayer, Alemanha); Angiocidina (InKine, EUA); A6 (Angstrom, EUA); KR 31372 (Korean Research Institute of Chemical Technology, Coréia do Sul); GW 2286 (GlaxoSmithKline, UK); EHT 0101 (ExonHit, França); CP 868596 (Pfizer, EUA); CP 564959 (OSI, EUA); CP 547632 (Pfizer, EUA); 786034 (GlaxoSmithKline, UK); KRN 633 (Kirin Brewery,
15 Japão); sistema de liberação de fármaco, intraocular, 2-metoxiestradiol (EntreMed, EUA); anginex (Maastricht University, Holanda e Minnesota University, EUA); ABT 510 (Abbott, EUA); AAL 993 (Novartis, Suíça); VEGI (ProteomTech, EUA); inibidores do fator de necrose alfa (National Institute on Aging, EUA); SU 11248 (Pfizer, EUA e SUGEN EUA); ABT
20 518 (Abbott, EUA); YH16 (Yantai Rongchang, China); S-3APG (Boston Childrens Hospital, EUA e EntreMed, EUA); Mab, KDR (ImClone Systems, EUA); Mab, alfa5beta1 (Protein Design, EUA); inibidor de KDR quinase (Celltech Group, UK e Johnson & Johnson, EUA); GFB 116 (South Florida University, EUA e Yale University, EUA); CS 706 (Sankyo,
25 Japão); pró-fármaco de combretastatina A4 (Arizona State University, EUA); chondroitinase AC (IBEX, Canadá); BAY RES 2690 (Bayer, Alemanha); AGM 1470 (Harvard University, EUA, Takeda, Japão e TAP, EUA); AG 13925 (Agouron, EUA); tetratiomolibdato (University of Michigan, EUA); GCS 100 (Wayne State University, EUA); CV 247 (Ivy
30 Medical, UK); CKD 732 (Chong Kun Dang, Coréia do Sul); Mab, fator de

crescimento endotelial vascular (Xenova, UK); irsogladina (INN) (Nippon Shinyaku, Japão); RG 13577 (Aventis, França); WX 360 (Wilex, Alemanha); esqualamina (pINN) (Genaera, EUA); RPI 4610 (Sirna, EUA); sulfato de galactofucana (Marinova, Austrália); inibidores de heparanase
 5 (InSight, Israel); KL 3106 (Kolon, Coréia do Sul); Honokiol (Emory University, EUA); ZK CDK (Schering AG, Alemanha); ZK Angio (Schering AG, Alemanha); ZK 229561 (Novartis, Suíça e Schering AG, Alemanha); XMP 300 (XOMA, EUA); VGA 1102 (Taisho, Japão); moduladores do receptor de VEGF (Pharmacopeia, EUA); antagonistas de VE-cadherin-2
 10 (ImClone Systems, EUA); Vasostatin (National Institutes of Health, EUA); vacina, Flk-1 (ImClone Systems, EUA); TZ 93 (Tsumura, Japão); TumS-tatin (Beth Israel Hospital, EUA); FLT 1 solúvel truncado (receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular) (Merck & Co, EUA); ligantes de Tie-2 (Regeneron, EUA); e inibidor de trombospondina 1 (Allegheny
 15 Health, Education and Research Foundation, EUA).

Alguns agentes de terapia do câncer incluem, mas, sem limitações: talidomida e análogos de talidomida (N-(2,6-dioxo-3-piperidil)ftalimida); tecogalan sódico (sulfated polissacarídeo peptidoglicano sulfatado); TAN 1120 (8-acetil-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-
 20 trihidroxi-1-metoxi-10-[[octahidro-5-hidroxi-2-(2-hidroxiopropil)-4,10-dimetil-pirano[3,4-d]-1,3,6-dioxazocin-8-il]oxi]-5,12-naftaceno-diona); suradista (ácido 7,7'-[carbonilbis[imino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonilimino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)-carbonilimino]]bis-1,3-naftalenodisulfônico sal tetra-sódico); SU 302; SU 301; SU 1498 ((E)-2-
 25 ciano-3-[4-hidroxi-3,5-bis(1-metiletil)fenil]-N-(3-fenilpropil)-2-propenamida); SU 1433 (4-(6,7-dimetil-2-quinoxalínil)-1,2-benzenediol); ST 1514; SR 25989; Tie-2 solúvel; derivados de SERM; Pharms; semaxanib (pINN) (3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)metileno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona); S 836; RG 8803; RESTIN; R 440 (3-(1-metil-1H-indol-3-il)-4-(1-metil-6-nitro-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona); R 123942 (1-

[6-(1,2,4-tiadiazol-5-il)-3-piridazinil]-N-[3-(trifluor-metil)fenil]-4-piperidinamina); inibidor de prolil hidroxilase; genes de progressão elavada; prinomastat (INN) (ácido (S)-2,2-dimetil-4-[[p-(4-piridiloxi)fenil]sulfonil]-3-tiomorfolinocarbohidroxâmico); NV 1030; NM 3 (ácido 8-hidroxi-6-metoxi-alfa-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-S-acético); NF 681; NF 050; MIG; METH 2; METH 1; manassantina B (alfa-[1-[4-[5-[4-[2-(3,4-dimetoxifenil)-2-hidroxi-1-metiletoxi]-3-metoxifenil]tetrahydro-3,4-dimetil-2-furanil]-2-metoxifenoxi]etil]-1,3-benzodioxol-5-metanol); anticorpo monoclonal de KDR; anticorpo monoclonal de integrina alfa5beta3; LY 290293 (2-amino-4-(3-piridinil)-4H-nafto[1,2-b]piran-3-carbonitrila); KP 0201448; KM 2550; peptídeos específicos de integrina; INGN 401; GYKI 66475; GYKI 66462; greenstatina (101-354-plasminogênio (humano)); terapia gênica para artrite reumatóide, câncer de próstata, câncer de ovário, glioma, endostatina, câncer colo-retal, ATF BTPI, genes da antiangiogênese, inibidor de angiogênese, ou angiogênese; inibidor de gelatinase, FR 111142 (éster 5-metoxi-4-[2-metil-3-(3-metil-2-butenil)-oxiranil]-1-oxaspiro[2.5]oct-6-il de ácido 4,5-dihidroxi-2-hexenóico); forfenimex (pINN) ácido (S)-alfa-amino-3-hidroxi-4-(hidroximetil) benzenoacético); antagonista de fibronectina (1-acetil-L-prolil-L-histidil-L-seril-L-cisteinil-L-aspartamida); inibidor do receptor do fator de crescimento de fibroblasto; antagonista do fator de crescimento de fibroblasto; FCE 27164 (ácido 7,7'-[carbonilbis[imino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil) carbonil-imino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonil-imino]]-bis-1,3,5-naftalenotrisulfônico sal hexassódico); FCE 26752 (ácido 8,8'-[carbonilbis[imino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)-carbonilimino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonilimino]]-bis-1,3,6-naftalenotrisulfônico); polipeptídeo II de ativação de monócito endotelial; oligonucleotídeo anti-senso VEGFR; fatores anti-angiogênicos e tróficos; agente angiostático ANCHOR; endostatina; proteína angiogênica Del-1; CT 3577; contortrostatina; CM 101; condroitinase AC; CDP 845; CanStatin; BST 2002; BST 2001; BLS

0597; BIBF 1000; ARRESTIN; apomigren (colagênio XV do tipo 1304-1388 (gene humano precursor de cadeia COL15A1 alfa1)); angioinhibina; aaATIII; A 36; acetato de 9-alfa-fluormedroxiprogesterona ((6-alfa)-17-(acetiloxi)-9-fluor-6-metil-pregn-4-eno-3,20-diona); ácido 2-metil-2-ftalimidino-glutárico (ácido 2-(1,3-dihidro-1-oxo-2H-isoindol-2-il)-2-metilpentanodióico); anticorpo monoclonal BC-1 rotulado com ítrio 90; Semaxanib (3-(4,5-dimetilpirrol-2-ilmetileno)indolin-2-ona) (C15 H14 N2 O); Pl 88 (sulfato de fosfomanopentose); Alvocidib (4H-1-benzopiran-4-ona, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-(3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil)-cis-(-)-) (C21 H20 Cl N O5); E 7820; SU 11248 (ácido 5-[3-fluor-2-oxo-1,2-dihidroindol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico(2-dietilaminoetil)amida) (C22 H27 F N4 O2); esqualamina (colestano-7,24-diol, 3-[[3-[(4-aminobutil)aminopropil]-amino]-, 24-(sulfato de hidrogênio), (3.beta.,5.alfa.,7.alfa.)-]) (C34 H65 N3 O5 S); Eriochrome Black T; AGM 1470 (ácido carbâmico, (cloroacetil)-, 5-metoxi-4-[2-metil-3-(3-metil-2-butenil)oxiranil]-1-oxaspiro[2,5]oct-6-il éster, [3R-[3alfa,4alfa (2R,3R), 5beta, 6beta]]) (C19 H28 Cl N O6); AZD 9935; BIBF 1000; AZD 2171; ABT 828; KS-interleucina-2; Uteroglobina; A6; NSC 639366 (fumarato de 1-[3-(dietilamino)-2-hidroxiopropil-amino]-4-(oxiran-2-ilmetilamino)antraquinona) (C24 H29 N3 O4 . C4 H4 O4); ISV 616; proteínas de fusão anti-ED-B; HUI 77; Troponina I; anticorpo monoclonal BC-1; SPV 5.2; ER 68203; CKD 731 (éster (3R,4S,5S,6R)-4-[2(R)-metil-3(R)-3(R)-(3-metil-2-butenil)oxiran-2-il]-5-metoxi-1-oxaspiro[2.5]oct-6-il do ácido 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2(E)-propenóico) (C28 H38 O8); IMC-1 C11; aaATIII; SC 7; CM 101; Angiocol; Kringle 5; CKD 732 (ácido 3-[4-[2-(dimetilamino)etoxi]fenil]-2(E)-propenóico)(C29 H41 N O6); U 995; Canstatina; SQ 885; CT 2584 (1-[11-(dodecilamino)-10-hidroxiundecil]-3,7-dimetilxantina) (C30 H55 N5 O3); Salmosina; EMAP II; TX 1920 (1-(4-metilpiperazino)-2-(2-nitro-1H-1-imidazol)-1-etanona) (C10 H15 N5 O3); inibidor de Alfa-v Beta-x; CHIR 11509 (N-(1-propinil)glicil-[N-(2-

naftil)]glicil-[N-(carbamoilmetil)]glicina-bis(4-metoxi-fenil)metilamida) (C
 36 H37 N5 O6); BST 2002; BST 2001; B 0829; FR 111142; éster
 (3R,4S,5S,6R)-4-[1(R),2(R)-epoxi-1,5-dimetil-4-hexenil]-5-metoxi-1-oxas-
 5 piro[2.5]octan-6-il de ácido 4,5-dihidroxi-2(E)-hexenóico (C22 H34 O7); e
 inibidores de quinase incluindo, mas, sem limitações, N-(4-clorofenil)-4-
 (4-piridinilmetil)-1-ftalazinamina; 4-[4-[[[4-cloro-3-(trifluormetil) fenil]
 amino]carbonil]amino]-fenoxi]-N-metil-2-piridinocarboxamida; N-[2-(di-
 etilamino)-etil]-5-[(5-fluor-1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-ilideno)-metil]-2,
 4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida; 3-[(4-bromo-2,6-difluorfenil) meto-
 10 xi]-5-[[[4-(1-pirrolidinil)butil]-amino]carbonil]amino]-4-isotiazolcarboxa-
 mida; N-(4-bromo-2-fluorfenil)-6-metoxi-7-[(1-metil-4-piperidinil)metoxi]-
 4-quinazolinamina; 3-[5,6,7,13-tetrahidro-9-[(1-metiletoxi)-metil]-5-oxo-
 12H-indeno[2,1-a]pirrol[3,4-c]carbazol-12-il]propil éster N,N-dimetil-
 glicina; N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperi-
 15 dinocarboxamida; N-[3-cloro-4-[(3-fluorfenil)metoxi]-fenil]-6-[5-[[[2-(metil
 sulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina; 4-[(4-metil-1-pi-
 perazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]
 benzamida; N-(3-cloro-4-fluorfenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-
 4-quinazolinamina; N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazoli-
 20 namina; N-(3-(((2R)-1-metil-2-pirrolidinil)metil)oxi)-5-(trifluormetil)fenil)-
 2-((3-(1,3-oxazol-5-il)fenil)amino)-3-piridinocarboxamida; 2-(((4-fluorfe-
 nil)metil)amino)-N-(3-(((2R)-1-metil-2-pirrolidinil)metil)oxi)-5-(trifluor-
 metil)fenil)-3-piridino-carboxamida; N-[3-(Azetidín-3-ilmetoxi)-5-trifluor-
 metil-fenil]-2-(4-fluor-benzilamino)-nicotinamida; 6-fluor-N-(4-(1-metil-
 25 etil)fenil)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridino-carboxamida; 2-((4-piridi-
 nilmetil)amino)-N-(3-(((2S)-2-pirrolidinilmetil)oxi)-5-(trifluormetil)fenil)-3-
 piridino-carboxamida; N-(3-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-5-il)-2-((4-piridi-
 nilmetil)amino)-3-piridinocarboxamida; N-(3,3-dimetil-2,3-dihidro-1-
 benzofuran-6-il)-2-((4-piridinil-metil)amino)-3-piridinocarboxamida; N-
 30 (3-(((2S)-1-metil-2-pirrolidinil)metil)oxi)-5-(trifluormetil)fenil)-2-((4-piridi-

nilmetil)amino)-3-piridinocarboxamida; 2-((4-piridinilmetil)amino)-N-(3-
((2-(1-pirrolidinil)etil)oxi)-4-(trifluormetil)fenil)-3-piridinocarboxamida; N-
(3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-indol-6-il)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridino-
carboxamida; N-(4-(pentafluoretil)-3-(((2S)-2-pirrolidinilmetil)oxi)fenil)-2-
5 ((4-piridinilmetil)amino)-3-piridinocarboxamida; N-(3-((3-azetidil-metil)
oxi)-5-(trifluormetil)fenil)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridinocarboxa-
mi-da; N-(3-(4-piperidiniloxi)-5-(trifluor-metil)fenil)-2-((2-(3-piridinil) etil)
amino)-3-piridino-carboxamida; N-(4,4-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro-isoqui-
nolin-7-il)-2-(1H-indazol-6-ilamino)-nicotinamida; 2-(1H-indazol-6-ilami-
10 no)-N-[3-(1-metilpirrolidin-2-ilmetoxi)-5-trifluor-metil-fenil]-nicotinanida;
N-[1-(2-dimetilaminoacetil)-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-indol-6-il]-2-(1H-
indazol-6-ilamino)-nicotinamida; 2-(1H-indazol-6-ilamino)-N-[3-(pirroli-
din-2-ilmetoxi)-5-trifluormetil-fenil]-nicotinamida; N-(1-acetil-3,3-di-me-
til-2,3-dihidro-1H-indol-6-il)-2-(1H-indazol-6-ilamino)-nicotinamida; N-
15 (4,4-dimetil-1-oxo-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-7-il)-2-(1H-indazol-6-il-
amino)-nicotinamida; N-[4-(tert-butil)-3-(3- piperidilpropil)fenil][2-(1H-
indazol-6-ilamino)(3-piridil)]carboxamida; N-[5-(tert-butil)isoxazol-3-il][2-
(1H-indazol-6-ilamino)(3-piridil)]carboxamida; e N-[4-(tert-butil)fenil][2-
(1H-indazol-6-ilamino)(3-piridil)]-carboxamida e os inibidores de quinase
20 descritos nas patentes US 6.258.812, 6.235.764, 6.630.500, 6.515.004,
6.713.485, 5.521.184, 5.770.599, 5.747.498, 5.990.141, publicação do
pedido de patente US nº US2003/0105091; e publicações PCT nºs WO
01/37820; WO 01/32651; WO 02/68406; WO 02/66470; WO
02/55501; WO 04/05279; WO 04/07481; WO 04/07458; WO
25 04/09784; WO 02/59110; WO 99/45009; WO 98/35958; WO
00/59509; WO 99/61422; WO 00/12089; e WO 00/02871, publicações
dos quais são incorporados aqui como referência para qualquer propósi-
to.

Em certas realizações, um agente de ligação específica a

EGFr pode ser utilizado sozinho ou com pelo menos um agente terapêutico adicional para o tratamento de um câncer relacionado a EGFr. Em certas realizações, um agente de ligação específica a EGFr é utilizado em conjunto com uma quantidade terapêuticamente efetiva de um agente terapêutico adicional. Os agentes terapêuticos típicos que podem ser administrados com um agente de ligação específica a EGFr incluem, mas, sem limitações, um membro da família da geldanamicina do antibiótico anisamicina; Pro-HGF; NK2; um inibidor do peptídeo c-Met; um antagonista de Grb2 Src de homologia 2; um modulador de Gab1; Src negativo dominante; um inibidor de von-Hippel-Landau, incluindo, mas, sem limitações, wortmanina; inibidores de P13 quinase, outras terapias anti-receptor, um inibidor de COX-2, Celebrex™, celecoxib, Vioxx™, rofecoxib; um fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um modulador de VEGF, um fator de crescimento de fibroblasto (FGF), um modulador de FGF, um fator de crescimento epitelial (EGF); um modulador de EGF; um fator de crescimento de queratinócito (KGF), uma molécula relacionada a KGF, um modulador de KGF; e um modulador de matriz de metaloproteinase (MMP).

Em certas modalidades, um agente de ligação específica a EGFr é utilizado com agentes terapêuticos particulares para tratar vários cânceres. Em certas realizações, tendo em vista da condição e do nível de tratamento desejados, dois, três ou mais agentes podem ser administrados. Onde os compostos são utilizados com um ou mais outros componentes, o composto e o um ou mais componentes podem ser administrados em conjunto, separadamente, ou seqüencialmente (por exemplo, em uma formulação farmacêutica). Em certas realizações, tais agentes podem ser providos juntos por inclusão na mesma formulação. Em certas modalidades, tais agentes e um agente de ligação específica a EGFr podem ser providos juntos por inclusão na mesma formulação. Em certas realizações, esses agentes podem ser formulados

separadamente e providos juntos por inclusão em um kit de tratamento. Em certas realizações, tais agentes e um agente de ligação específica a EGFr podem ser formulados separadamente e providos juntos por inclusão em um kit de tratamento. Em certas realizações, tais agentes
5 podem ser providos separadamente.

Em certas modalidades, quando administrados por terapia gênica, os genes que codificam agentes protéicos e/ou um agente de ligação específica a EGFr podem ser incluídos no mesmo vetor. Em certas realizações, os genes que codificam agentes protéicos e/ou um
10 agente de ligação específica a EGFr podem estar sob o controle da mesma região promotora. Em certas modalidades, os genes que codificam agentes protéicos e/ou um agente de ligação específica a EGFr podem estar em vetores separados.

Em certas realizações, um agente de ligação específica a EGFr pode ser utilizado para tratar animais não humanos, tais como
15 animais de companhia (cães, gatos, pássaros, primatas etc.) e animais de fazenda domésticos (cavalos, gado, ovelhas, porcos, pássaros etc.). Em alguns destes casos, uma dose apropriada pode ser determinada de acordo com o peso corporal do animal. Por exemplo, em certas modali-
20 dades, uma dose de 0,2-1 mg/kg pode ser utilizada. Em certas realizações, a dose pode ser determinada de acordo com a área superficial do animal, uma dose típica variando de 0,1 a 20 mg/in², ou de 5 a 12 mg/m². Para animais pequenos, tais como cães ou gatos, em certas realizações, uma dose adequada é de 0,4 mg/kg. Em certas modalida-
25 des, os agentes de ligação específica a EGFr são administrados por injeção ou outra rota adequada, uma ou mais vezes por semana até que a condição do animal melhore, ou podem ser administrados indefinidamente.

Entende-se que a resposta por pacientes individuais às me-
30 dicacões ou terapias por combinação mencionadas acima pode variar e

uma combinação eficaz apropriada de fármacos para cada paciente pode ser determinada por seu médico.

O macaco cynomolgus provê um modelo útil para certas doenças. Doenças típicas incluem, mas, sem limitações, síndrome da
5 rejeição a transplante e doenças semelhantes à doença inflamatória dos intestinos. Quando se testa a eficácia de um anticorpo monoclonal humano em um modelo da doença humana em macaco cynomolgus, em certas realizações, é útil se determinar se o agente de ligação específica a EGFr se liga a EGFr em humanos e macacos cynomolgus em um nível
10 comparável.

Em certas modalidades, um agente de ligação específica a EGFr pode ser parte de uma molécula conjugada compreendendo todo ou parte do agente de ligação específica a EGFr e um agente citotóxico. O termo “agente citotóxico” refere-se a uma substância que inibe ou
15 previne a função de células e/ou causa a morte ou destruição de células. O termo inclui, mas não se limita a, isótopos radioativos (por exemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ e Re¹⁸⁶), agentes quimioterápicos e toxinas tais como toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destas. Os agentes citotóxicos típicos
20 incluem, mas, sem limitações, Adriamicina, Doxorrubicina, 5-Fluoruracil, Citosina arabinosídeo (“Ara-C”), Ciclofosfamida, Tiotepa, Taxotere (docetaxel), Busulfan, Citoxin, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalan, Vinblastina, Bleomicina, Etoposídeo, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincreistina, Vinorelbina, Carboplatina, Teniposídeo,
25 Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas, Melfalan e outros nitrogênio mustardas relacionados.

Em certas realizações, um agente de ligação específica a EGFr pode ser parte de uma molécula conjugada compreendendo todo
30 ou parte do agente de ligação específica a EGFr e um pró-fármaco. Em

certas modalidades, o termo “pró-fármaco” refere-se a um precursor ou forma derivada de uma substância farmacologicamente ativa. Em certas modalidades, um pró-fármaco é menos citotóxico às células quando em comparação com o fármaco parental e é capaz de ser enzimaticamente
5 ativado ou convertido à forma parental citotóxica mais ativa. Pró-fármacos típicos incluem, mas, sem limitações, pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo peptídeo, pró-fármacos modificados com D-aminoácido, pró-fármacos glicosiladas, pró-fármacos contendo beta-
10 lactama, pró-fármacos contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituída e pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, pró-fármacos de 5-fluorocitosina e outros pró-fármacos de 5-fluoruridina que podem ser convertidos em um fármaco livre citotóxico mais ativo. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivatizados em uma forma de pró-fármaco incluem, mas, sem limitações,
15 aqueles agentes citotóxicos descritos acima. Ver, por exemplo, Patente US 6.702.705.

Em certas realizações, conjugados de anticorpo funcionam tendo a parte do anticorpo da molécula alvo a parte citotóxica ou parte
20 do pró-fármaco da molécula a uma população específica de células no paciente. No caso de agentes de ligação específica a EGFR, tais moléculas conjugadas podem ser utilizadas, por exemplo, em certas realizações, para eliminar células em proliferação anormal, tais como células cancerígenas.

25 Em certas modalidades, são providos métodos de tratamento de um paciente compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente efetiva de um agente de ligação específica a EGFR. Em certas realizações, são providos métodos de tratamento de um paciente compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente
30 efetiva de um conjugado de anticorpo. Em certas modalidades, é utiliza-

do um anticorpo em conjunto com uma quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos um agente terapêutico adicional, conforme discutido acima.

Conforme discutido acima, em certas realizações, agentes de
5 ligação específica a EGFr podem ser administrados concorrentemente com um ou mais fármacos que são administrados ao mesmo paciente, cada fármaco sendo administrado de acordo com um regime adequado para este medicamento. Esse tratamento engloba pré-tratamento, tratamento simultâneo, tratamento seqüencial e regimes alternativos.
10 Exemplos adicionais de tais fármacos, incluem, mas, sem limitações, antivirais, antibióticos, analgésicos, corticosteróides, antagonistas de citocinas inflamatórias, DMARDs, antiinflamatórios não esteroidais, quimioterápicos e estimulantes de angiogênese.

Em certas modalidades, vários distúrbios médicos são tra-
15 tados com agentes de ligação específica a EGFr em combinação com um estimulante de apoptose. Por exemplo, em certas realizações, agentes de ligação específica a EGFr podem ser administrados em uma composição que contém também um composto que estimula apoptose de uma ou mais células. Em certas modalidades, o agente de ligação específica
20 a EGFr e estimulantes de apoptose podem ser administrados como composições separadas e estes podem ser administrados pela mesma rota ou rota diferente.

Em certas modalidades, são providas composições farma-
cêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de
25 um agente de ligação específica a EGFr e um diluente, veículo, solubilizante, emulsificante, conservante e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitável.

Em certas realizações, são providas composições farmacêu-
ticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de um
30 agente de ligação específica a EGFr e uma quantidade terapeuticamente

efetiva de pelo menos um agente terapêutico adicional e um diluente, veículo, solubilizante, emulsificante, conservante e/ou adjuvante farmacologicamente aceitável.

Em certas modalidades, os materiais de formulação aceitáveis são não tóxicos aos recipientes nas dosagens e concentrações empregadas.

Em certas realizações, a composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou preservar, por exemplo, o pH, osmolaridade, viscosidade, cor, claridade, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração da composição. Em certas modalidades, os materiais de formulação adequados incluem, mas, sem limitações, aminoácidos (tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tais como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogenossulfito de sódio); tampões (tais como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos); agentes de enchimento (tais como manitol ou glicina); agentes quelantes (tais como ácido etilendiamino-tetracético (EDTA)); agentes complexantes (tais como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina); enchimentos; monossacarídeos, dissacarídeos; e outros carboidratos (tais como glicose, manose ou dextrinas); proteínas (tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas); agentes corantes, flavorizantes ou diluentes; agentes emulsificantes; polímeros hidrofílicos (tais como polivinilpirrolidona); polipeptídeos de baixo peso molecular; contra-íons formadores de sal (tais como sódio); conservantes (tais como cloreto de benzalcônio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorohexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio); solventes (tais como glicerina, propilenoglicol ou polietilenoglicol); álcoois sacarídeos (tais como manitol ou sorbitol); agentes de suspensão; surfactantes ou

agentes de umectante (tais como plurônicos, PEG, ésteres de sorbitana, polissorbatos tais como polissorbato 20, polissorbato 80, triton, trome-
tamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes melhoradores de estabili-
dade (tais como sacarose ou sorbital); agentes melhoradores de tonici-
5 dade (tais como haletos de metal alcalino, preferivelmente cloreto de
sódio ou potássio, manitol sorbitol); veículos de liberação; diluentes,
excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos. (*Remington's Pharmaceuti-
cal Sciences*, 18ª Edição, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company
(1990)).

10 Em certas realizações, um agente de ligação específica a
EGFr e/ou uma molécula terapêutica adicional são ligados a um veículo
de extensão de meia vida conhecido na técnica. Esses veículos incluem,
mas, sem limitações, o domínio Fc, polietilenoglicol e dextrana. Tais
veículos são descritos, por exemplo, na Patente US 6.660.843 e pedido
15 PCT nº WO 99/25044.

Em certas modalidades, a composição farmacêutica ideal se-
rá determinada por um especialista na técnica dependendo, por exem-
plo, da rota de administração pretendida, do formato de liberação e
dosagem desejada. Ver, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical*
20 *Sciences, supra*. Em certas realizações, tais composições podem influ-
enciar o estado físico, a estabilidade, taxa de liberação *in vivo* e taxa de
disponibilidade *in vivo* dos agentes de ligação específica a EGFr.

Em certas modalidades, o veículo primário em uma compo-
sição farmacêutica pode ser de natureza ou aquosa ou não aquosa. Por
25 exemplo, em certas realizações, um veículo adequado pode ser água
para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cerebrospinal artificial,
possivelmente suplementado com outros materiais comuns em compo-
sições para administração parenteral. Em certas modalidades, solução
salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina de
30 soro são veículos típicos adicionais. Em certas modalidades, as compo-

sições farmacêuticas compreendem tampão Tris com pH de cerca de 7,0-8,5, ou tampão acetato de pH de cerca de 4,0-5,5, que pode incluir adicional sorbitol ou um substituto adequado deste. Em certas realizações, uma composição farmacêutica é uma formulação aquosa ou líquida compreendendo um tampão acetato de pH de cerca de 4,0-5,5, um poliol (poliálcool) e opcionalmente, um surfactante, onde a composição não compreende um sal, por exemplo, cloreto de sódio e onde a composição é isotônica para o paciente. Polióis típicos incluem, mas, sem limitações, sacarose, glicose, sorbitol e manitol. Um surfactante típico inclui, mas não se limita a, polissorbato. Em certas realizações, uma composição farmacêutica é uma formulação aquosa ou líquida compreendendo um tampão acetato de pH de cerca de 5,0, sorbitol e um polissorbato, onde a composição não compreende um sal, por exemplo, cloreto de sódio e onde a composição é isotônica para o paciente. Certas composições típicas são encontradas, por exemplo, na Patente US 6.171.586. Veículos farmacêuticos adicionais incluem, mas, sem limitações, óleos, incluindo petróleo, óleo animal, óleo vegetal, óleo de amendoim, óleo mineral, óleo de gergelim e outros. Em certas modalidades, soluções de dextrose aquosa e glicerol podem ser também empregadas como veículo líquido, particularmente para soluções injetáveis. Em certas realizações, uma composição compreendendo um anticorpo, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, pode ser preparada para armazenamento por mistura da composição farmacêutica apresentando o grau desejado de pureza com agentes de formulação idéias (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) na forma de uma torta liofilizada ou uma solução aquosa. Além disto, em certas modalidades, uma composição compreendendo um anticorpo, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, pode ser formulada como uma liofilizado utilizando-se soluções excipientes apropriadas (por exemplo, sacarose) como diluentes.

Em certas realizações, é administrado um agente de ligação específica a EGFr na forma de uma composição fisiologicamente aceitável compreendendo uma proteína recombinante purificada em conjunto com veículos fisiologicamente aceitáveis. Em certas modalidades, tais 5 veículos são não tóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações empregadas. Em certas realizações, a preparação de tais composições pode envolver a combinação do agente de ligação específica a EGFr com tampões, antioxidantes tais como ácido ascórbico, polipeptídeos de baixo peso molecular (tais como os que contêm menos de 10 aminoáci- 10 dos), proteínas, aminoácidos, carboidratos tais como glicose, sacarose ou dextrinas, agentes quelantes tais como EDTA, glutatona e/ou outros estabilizantes e excipientes. Em certas modalidades, as dosagens apropriadas são determinadas em ensaios de dosagem padrão e podem variar de acordo com a rota de administração escolhida. Em certas 15 realizações, de acordo com padrões industriais apropriados, podem ser adicionados conservantes, os quais incluem, mas, sem limitações, álcool benzílico. Em certas modalidades, a quantidade e frequência de administração podem ser determinadas com base em fatores tais como a natureza e severidade da doença sendo tratada, a resposta desejada, a 20 idade e condição do paciente e assim em diante.

Em certas realizações, as composições farmacêuticas podem ser selecionadas para administração parenteral. A preparação de tais composições farmacêuticamente aceitáveis é do conhecimento do especialista na técnica.

25 Em certas modalidades, os componentes da formulação estão presentes em concentrações que são aceitáveis no local de administração. Em certas realizações, são utilizados tampões para manter a composição no pH fisiológico ou a um pH ligeiramente mais baixo, tipicamente em um pH na faixa de cerca de 5 a cerca de 8.

30 Em certas realizações, quando é contemplada a administra-

ção parenteral, uma composição terapêutica pode estar na forma de uma solução aquosa livre de pirogênio parenteralmente aceitável, compreendendo o anticorpo desejado, com ou sem agentes terapêuticos adicionais, em um veículo farmacêutica. Em certas modalidades, um
5 veículo para injeção parenteral é água destilada estéril na qual o anticorpo, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, é formulado como uma solução estéril isotônica, apropriadamente preservada. Em certas modalidades, a preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, tal como micro-esferas injetáveis,
10 partículas biodegradáveis, compostos poliméricos (tais como ácido poliacético ou ácido poliglicólico), pérolas, ou lipossomas, que podem conferir liberação sustentada do produto que pode então ser administrado por meio de uma injeção depot. Em certas realizações, ácido hialurônico pode ser também utilizado e pode apresentar o efeito de
15 promover duração sustentada na circulação. Em certas modalidades, dispositivos de liberação de fármaco implantáveis podem ser utilizados para introduzir a molécula desejada.

Em certas realizações, uma composição farmacêutica pode ser formulada para inalação. Em certas modalidades, um agente de
20 ligação específica a EGFr, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, pode ser formulado como um pó seco para inalação. Em certas modalidades, uma solução de inalação compreendendo um agente de ligação específica a EGFr, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, pode ser formulada com um propelente para
25 administração por aerossol. Em certas realizações, podem ser soluções nebulizadas. A administração pulmonar é adicionalmente descrita na publicação PCT n° WO 94/20069, que descreve a administração pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

Em certas modalidades, é contemplado que formulações podem ser administradas oralmente. Em certas realizações, um agente de
30

ligação específica a EGFr, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, que é administrado desta forma pode ser formulado com ou sem os veículos utilizados comumente na composições de formas de dosagem sólidas tais como tabletes e cápsulas. Em certas modalidades, uma cápsula pode ser projetada para liberar a parte ativa da formulação no ponto do trato gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pré-sistêmica é minimizada. Em certas realizações, pelo menos um agente adicional pode ser incluído para facilitar a absorção do agente de ligação específica a EGFr e/ou quaisquer agentes terapêuticos adicionais. Em certas modalidades, diluentes, flavorizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de desintegração de tablete, e/ou ligantes podem ser também empregados.

Em certas realizações, uma composição farmacêutica pode envolver uma quantidade efetiva de um agente de ligação específica a EGFr, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, em uma mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para a fabricação de tabletes. Em certas modalidades, podem ser preparadas soluções na forma de dosagem única pela dissolução de tabletes em água estéril ou outro veículo apropriado. Excipientes adequados incluem, mas, sem limitações, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose, ou fosfato de cálcio; e agentes ligantes, tais como amido, gelatina e acácia; e agentes lubrificantes tais como estearato de magnésio, ácido esteárico e talco.

Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes aos especialistas na técnica, incluindo formulações envolvendo um agente de ligação específica a EGFr, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, em formulações de liberação sustentada ou controlada. Certas formulações de liberação sustentada ou controlada típicas incluem, mas, sem limitações, veículos lipossômicos, micro-partículas

biodegradáveis, pérolas porosas e injeções depot. Algumas técnicas típicas para a preparação de algumas formulações são conhecidas dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, publicação PCT nº WO 93/15722, que descreve a liberação controlada de micro-partículas poliméricas porosas para a administração de composições farmacêuticas. Em certas modalidades, as preparações de liberação sustentada podem incluir matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes, ou micro-cápsulas. Matrizes de liberação sustentada incluem, mas, sem limitações, poliésteres, hidrogéis, polilactídeos (Patentes US 3.773.919 e EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutâmico gama etil-L-glutamato (Sidman e colaboradores, *Biopolymers*, **22**:547-556 (1983)), poli-(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer e colaboradores, *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**:167-277 (1981) e Langer, *Chem. Tech.*, **12**:98-105 (1982)), acetato de etilenovinila (Langer e colaboradores, *supra*) e ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988). Em certas modalidades, as composições de liberação sustentada podem incluir também lipossomas, os quais podem ser preparados, em certas realizações, por qualquer um de vários métodos conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Eppstein e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:3688-3692 (1985); EP 036.676; EP 088.046 e EP 143.949.

Em certas realizações, a composição farmacêutica a ser utilizada para administração *in vivo* é estéril. Em certas modalidades, a composição farmacêutica a ser utilizada para administração *in vivo* é esterilizada por filtração através de membranas de filtração estéril. Em certas modalidades, onde a composição é liofilizada, a esterilização utilizando membranas de filtração estéril pode ser conduzida ou antes ou após a liofilização e reconstituição. Em certas realizações, a composição para administração parenteral pode ser armazenada na forma liofilizada ou em uma solução. Em certas modalidades, as composições parenterais em geral são colocadas em um recipiente contendo uma

porta de acesso estéril, por exemplo, uma bolsa ou frasco de solução intravenosa contendo um tampão perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

Em certas modalidades, após a composição farmacêutica ter sido formulada, esta pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou como um pó desidratado ou liofilizado. Em certas realizações, tais formulações podem ser armazenadas ou uma forma pronta para utilização ou em uma forma (por exemplo, uma forma liofilizada) que é reconstituída antes da administração.

Em certas modalidades, são providos kits para a produção de uma unidade de administração de dose única. Em certas realizações, os kits podem apresentar cada um tanto um primeiro recipiente contendo uma proteína seca quanto um segundo recipiente contendo uma formulação aquosa. Em certas modalidades, são incluídos kits contendo seringas de câmara única e/ou múltipla cheias previamente (por exemplo, seringas para líquido e “lyosyringes”).

Em certas realizações, a quantidade efetiva de uma composição farmacêutica compreendendo um agente de ligação específica a EGFr, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, a ser empregada terapêuticamente irá depender, por exemplo, do contexto e dos objetivos terapêuticos. Um especialista na técnica observará que os níveis de dosagem apropriados para o tratamento, de acordo com certas realizações, irão variar desta forma dependendo, em parte, da molécula utilizada, da indicação para a qual o agente de ligação específica a EGFr, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, está sendo utilizado, da rota de administração e do tamanho (peso corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e/ou condição (idade e saúde geral) do paciente. Em certas realizações, o clínico pode titular a dosagem e modificar a rota de administração para obter o efeito terapêu-

tico ótimo. Em certas modalidades, uma dosagem típica pode variar de cerca de 0,1 µg/kg a até cerca de 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Em certas realizações, a dosagem pode variar de 0,1 µg/kg a até cerca de 100 mg/kg; ou 1 µg/kg até cerca de
5 100 mg/kg; ou 5 µg/kg a até cerca de 100 mg/kg.

Em certas realizações, a frequência de dosagem irá considerar os parâmetros farmacocinéticos do agente de ligação específica a EGFr e/ou quaisquer agentes terapêuticos adicionais na formulação utilizada. Em certas realizações, um clínico irá administrar a composição até que seja atingida uma dosagem que obtenha o efeito desejado.
10 Em certas modalidades, a composição pode, por esta razão, ser administrada como uma dose única, ou como duas ou mais doses (que podem ou não conter a mesma quantidade da molécula desejada), ou como uma infusão contínua por meio de um dispositivo de implante ou
15 cateter. Alguns métodos de refino adicional da dosagem apropriada são de conhecimento do especialista na técnica. Em certas realizações, as dosagens apropriadas podem ser determinadas através da utilização de dados dose-resposta apropriados.

Em certas realizações, a rota de administração da composição farmacêutica é de acordo com métodos conhecidos, por exemplo,
20 oralmente, por meio de injeção intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intra cerebroventricular, intramuscular, intraocular, intra-arterial, intraportal ou rotas intralesionais; por sistemas de liberação sustentada ou por dispositivos de implante. Em certas
25 modalidades, as composições podem ser administradas por injeção de bolus ou continuamente por infusão, ou por um dispositivo implantado.

Conforme discutido acima, em várias realizações, qualquer rota eficaz de administração pode ser utilizada para administrar um agente de ligação específica a EGFr. Se injetado, em certas realizações,
30 um agente de ligação específica a EGFr pode ser administrado, por

exemplo, via rota intra-articular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intracraniana, intranasal, inalação ou subcutânea por injeção de bolus ou por infusão contínua. Métodos típicos de administração incluem, mas, sem limitações, a liberação sustentada a partir de implantes, a inalação por aerossol, colírios, preparações orais, incluindo 5 pílulas, xaropes, comprimidos e gomas de mascar e as preparações tópicas tais como loções, géis, sprays, unguentos e outras técnicas adequadas.

Em certas realizações, a administração por inalação é benéfica quando do tratamento de doenças associadas com distúrbios pulmonares. Em certas modalidades, um agente de ligação específica a EGFr pode ser administrado por implante de células cultivadas que expressam um agente de ligação específica a EGFr. Em certas realizações, as próprias células do paciente são induzidas a produzir por 15 transfecção *in vivo* ou *ex vivo* com um ou mais vetores que codificam um agente de ligação específica a EGFr. Em certas modalidades, este vetor pode ser introduzido nas células do paciente, por exemplo, por injeção de DNA nu ou DNA que codifica um agente de ligação específica a EGFr encapsulado em lipossoma, ou por outros métodos de transfecção. 20 Quando um agente de ligação específica a EGFr é administrado em combinação com um ou mais outros compostos biologicamente ativos, em certas realizações, estes podem ser administrados pela mesma rota ou rota diferente e podem ser administrados em conjunto, separadamente, ou seqüencialmente.

25 Em certas modalidades, a composição pode ser administrada localmente por meio de implante de uma membrana, chumaço de algodão ou um outro material apropriado no qual a molécula desejada foi absorvida ou encapsulada. Em certas realizações, onde é utilizado um dispositivo de implante, o dispositivo pode ser implantado em 30 qualquer tecido ou órgão adequado e a administração da molécula

desejada pode ser por meio de difusão, bolus de liberação controlada no tempo, ou administração contínua.

Em certas modalidades, pode ser desejável se utilizar uma composição farmacêutica compreendendo um agente de ligação específica a EGFr, como ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, de uma forma *ex vivo*. Nessas realizações, células, tecidos e/ou órgãos que foram removidos do paciente são expostos a uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo, com ou sem pelo menos agente terapêutico adicional, após o que as células, tecidos e/ou órgãos são subseqüentemente implantados de volta no paciente.

Em certas realizações, um agente de ligação específica a EGFr e quaisquer agentes terapêuticos adicionais podem ser administrados por implante de certas células que foram geneticamente engeneiradas, utilizando-se métodos tais como os descritos aqui, para expressar e secretar os polipeptídeos. Em certas modalidades, tais células podem ser células animais ou humanas e podem ser autólogas, heterólogas, ou xenogênicas. Em certas realizações, as células podem ser imortalizadas. Em certas modalidades, de maneira a reduzir a chance de uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para se evitar infiltração nos tecidos circunvizinhos. Em certas realizações, os materiais de encapsulamento são tipicamente compartimentos ou membranas poliméricos biocompatíveis semipermeáveis que permitam a liberação da(s) proteína(s), mas evitam a destruição das células pelo sistema imunológico do paciente ou por outros fatores negativos dos tecidos circunvizinhos.

Alguns Métodos Típicos

Em certas realizações, é provido um método para prever se um tratamento com agente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr em um indivíduo. Em certas modalidades, o método compreende a determinação do número

de cópias do gene de EGFr em uma amostra do indivíduo. Em certas realizações, a presença de um número de cópias do gene de EGFr aumentado na amostra prediz que um tratamento com agente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr no indivíduo. Em certas modalidades, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr. Em certas realizações, o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo anti-EGFr humano. Em certas modalidades, o anticorpo anti-EGFr é o panitumumab. Em certas modalidades, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterapêutico. Em certas modalidades, o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido. Em certas realizações, o tumor sólido compreende pelo menos um câncer selecionado de câncer colo-retal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer renal e câncer de pescoço e cabeça.

Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr na amostra compreende a comparação do número de cópias do gene de EGFr na amostra com o número de cópias do gene de EGFr em uma amostra de referência normal. Em certas modalidades, a amostra de referência normal é do mesmo indivíduo da amostra. Em certas realizações, a amostra de referência normal não é do mesmo indivíduo da amostra. Em certas modalidades, a amostra de referência normal é do mesmo tecido da amostra. Em algumas destas modalidades, a amostra de referência normal é de tecido não tumoral e a amostra é do tecido tumoral. Em algumas destas realizações, a amostra de referência normal é de tecido não maligno e a amostra é de tecido maligno. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende análise de hibridização *in situ* fluorescente. Em certas realizações, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende PCR quantitativa. Em certas modalidades, a

determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende análise Southern blot. Em certas realizações, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende uma outra metodologia de determinação do número de cópias de gene descrita aqui. Em certas modalidades, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr. Em certas realizações, o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo anti-EGFr humano. Em certas modalidades, o anticorpo anti-EGFr é o panitumumab. Em certas realizações, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterapêutico. Em certas realizações, o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido. Em certas modalidades, o tumor sólido compreende pelo menos um câncer selecionado de câncer colo-retal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer renal e câncer de pescoço e cabeça.

Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma amostra compreende a determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma amostra de teste de um tumor no indivíduo, determinação do número de cópias de pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência na amostra de teste e comparação do número de cópias do gene de EGFr na amostra de teste com o número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência. Em certas realizações, um número aumentado de cópias do gene de EGFr na amostra de teste em relação ao número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência prediz que um tratamento com agente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr no indivíduo. Em certas modalidades, a pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência está localizada no mesmo cromossomo que o gene de EGFr. Em certas realizações, a pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de

referência está localizada em um outro cromossomo que não o cromossomo em que o EGFr está localizado. Em certas modalidades, o número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência é de duas cópias por célula. Em certas realizações, a pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência é uma seqüência centromérica.

5 Em certas modalidades, a proporção de número de cópias do gene de EGFr para o número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência em uma amostra normal é de 1. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr e do

10 número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência compreende análise de hibridização *in situ* fluorescente. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr e do número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência compreende PCR quantitativa. Em certas realizações,

15 a determinação do número de cópias do gene de EGFr e do número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência compreende análise Southern blot. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr e do número de cópias da pelo menos uma seqüência de nucleotídeos de referência compreende

20 uma outra metodologia de determinação do número de cópias de gene. Em certas modalidades, o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido. Em certas realizações, o tumor sólido compreende pelo menos um câncer selecionado de câncer colo-retal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer renal e câncer de

25 pescoço e cabeça. Em certas realizações, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr. Em certas modalidades, o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo anti-EGFr humano. Em certas realizações, o anticorpo anti-EGFr é o panitumumab. Em certas modalidades, o tratamento com agente de ligação

30 específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e

pelo menos um agente quimioterapêutico.

Em certas realizações, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende: a determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma amostra de teste do indivíduo; determinação do número de núcleos na amostra de teste; e comparação do número de cópias do gene de EGFr com o número de núcleos. Em certas modalidades, uma proporção entre o número de cópias do gene de EGFr e o número de núcleos acima de dois prediz que um tratamento com agente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr no indivíduo. Em certas modalidades, a proporção do número de cópias do gene de EGFr para o número de núcleos em uma amostra normal é de 2. Em certas modalidades, um número de cópias do gene de EGFr aumentado em uma amostra é indicado pela proporção do número de cópias do gene de EGFr para o número de núcleos acima de 2. Em certas modalidades, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr. Em certas realizações, o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo anti-EGFr humano. Em certas realizações, o anticorpo anti-EGFr é o panitumumab. Em certas modalidades, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterapêutico. Em certas realizações, o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido. Em certas modalidades, o tumor sólido compreende pelo menos um câncer selecionado de câncer colo-retal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer renal e câncer de pescoço e cabeça.

Em certas realizações, a determinação do número de cópias do gene de EGFr e do número de núcleos compreende análise de hibridização *in situ* fluorescente. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr e do número de núcleos compreende PCR quantitativa. Em certas realizações, a determinação

do número de cópias do gene de EGFr e do número de núcleos compreende análise Southern blot. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr e do número de núcleos compreende uma outra metodologia de determinação do número de cópias de gene descrita aqui. Em certas modalidades, o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido. Em certas realizações, o tumor sólido compreende pelo menos um câncer selecionado de câncer colo-retal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer renal e câncer de pescoço e cabeça. Em certas modalidades, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr. Em certas realizações, o tratamento com anticorpo anti-EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr humano. Em certas modalidades, o anticorpo anti-EGFr é o panitumumab. Em certas realizações, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterapêutico.

Em certas modalidades, é provido um método para o tratamento de um indivíduo apresentando um câncer relacionado com EGFr, compreendendo: a determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma amostra do indivíduo, determinação de se há um aumento do número de cópias do gene de EGFr na amostra; e se houver um aumento do número de cópias do gene de EGFr na amostra, administração ao indivíduo de uma quantidade farmacologicamente efetiva de um agente de ligação específica a EGFr. Em certas realizações, o agente de ligação específica a EGFr é um anticorpo anti-EGFr. Em certas modalidades, o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo humano. Em certas realizações, o anticorpo anti-EGFr é o panitumumab. Em certas modalidades, o tratamento com agente de ligação específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterapêutico. Em certas realizações, a determinação do número de cópias do

gene de EGFr compreende análise de hibridização *in situ* fluorescente. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende PCR quantitativa. Em certas realizações, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende análise Southern blot. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende uma outra metodologia de determinação do número de cópias de gene descrita aqui. Em certas modalidades, o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido. Em certas realizações, o tumor sólido compreende pelo menos um câncer selecionado de câncer colo-retal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer renal e câncer de pescoço e cabeça.

Em certas modalidades, é provido um método para a determinação da eficácia de um tratamento em um paciente, que compreende: (a) determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma primeira amostra obtida de um paciente de maneira a se obter um primeiro nível de número de cópias do gene de EGFr; (b) determinação do número de cópias do gene de EGFr em uma segunda amostra do paciente no momento seguinte à administração do tratamento, gerando, desta forma, um segundo nível de número de cópias do gene de EGFr; e (c) comparação dos níveis de número de cópias do gene de EGFr da primeira e da segunda amostras, onde uma redução do número de cópias do gene de EGFr do segundo nível do número de cópias do gene de EGFr em relação ao primeiro nível de número de cópias do gene de EGFr indica que o tratamento é efetivo no paciente. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende análise de hibridização *in situ* fluorescente. Em certas realizações, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende PCR quantitativa. Em certas modalidades, a determinação do número de cópias do gene de EGFr compreende análise Southern blot. Em certas realizações, a determinação do número de cópias do gene de EGFr

compreende uma outra metodologia de determinação do número de cópias de gene descrita aqui. Em certas modalidades, o tratamento compreende um agente de ligação específica a EGFr. Em certas realizações, o agente de ligação específica a EGFr é um anticorpo anti-EGFr. Em certas realizações, o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo humano. Em certas modalidades, o anticorpo anti-EGFr é o panitumumab. Em certas realizações, o tratamento compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterapêutico. Em certas modalidades, o tratamento é para um câncer relacionado com EGFr. Em certas realizações, o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido. Em certas modalidades, o tumor sólido compreende pelo menos um câncer selecionado de câncer colo-retal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer renal e câncer de pescoço e cabeça.

Os exemplos a seguir, incluindo os experimentos conduzidos e resultados obtidos são providos com propósito ilustrativo apenas e não devem ser entendidos como limitantes da presente invenção.

Exemplo 1

Isolamento de Amostras de Tumor CRC e Correlação

Com o Tratamento com PANITUMUMAB

Dez pacientes foram selecionados entre pacientes cadastrados no Ospedale Niguarda Ca' Granda para um experimento clínico com panitumumab (anticorpo monoclonal IgG2 humano para EGFr; Amgen Inc.) para o tratamento de câncer colo-retal expressando EGFr ("CRC"). Os protocolos de tratamento foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional. Os pacientes forneceram consentimento por escrito para receberem panitumumab, bem como para a análise de EGFr expresso por tumor e moléculas envolvidas na ativação de EGFr. Todos os dez pacientes foram resistentes a regimes quimioterápicos anteriores. Estes regimes quimioterápicos anteriores são mostrados na Tabela 1 abaixo.

As amostras do tumor do paciente foram analisadas para a expressão de EGFr utilizando-se o kit EGFRPharmDX (DAKO Corp.) de acordo com as instruções do fabricante. Todos os pacientes selecionados para o estudo apresentavam CRC metastático expressando EGFr, confirmado pela
5 presença de marcação de EGFr em pelo menos 1% das células malignas. Os pacientes foram tratados por via intravenosa com panitumumab com uma dose de 6 mg/kg a cada duas semanas até que a progressão da doença foi observada.

A resposta do tumor ao tratamento com panitumumab foi
10 avaliada por Imagem de Tomografia Computadorizada (“CT scan”) empregando os critérios dos “Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos” (RECIST) por radiologistas institucionais bem como independentes de acordo com os protocolos clínicos. O RECIST prevê diretrizes para a identificação da melhora, estabilidade ou progressão de
15 doença com base no tamanho do tumor (ver Therasse e colaboradores, February 2000, “New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors,” J. Natl. Cancer Inst. 92(3):205-216). Os resultados da análise RECIST dos pacientes tratados com o panitumumab são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1
Características Clínicas Relevantes
de Pacientes Tratados com Panitumumab

Paciente	Sexo	Idade	Número e Tipo de Regimes Quimioterápicos Anteriores	Resposta do Tumor ao Panitumumab	Duração da Resposta (semanas)
1-- 30624793	M	59	3: FOLFOX*, Capecitabina, FOLFIRI**	Resposta Parcial	33
2-- 2350661	F	2	2: FOLFOX, FOLFIRI	Resposta Parcial	24
3-- 30640715	M	57	2: FOLFIRI, FOLFOX	Resposta Parcial	16
4-- 30398321	F	78	3: FOLFOX, Capecitabina, FOLFIRI	Resposta Parcial	12+
5-- 10015851	F	52	4: FOLFOX, Irinotecan, Capecitabina, FOLFIRI	Doença Estável	32
6-- 30656334	M	71	2: FOLFOX, FOLFIRI	Doença Estável	16+
7-- 30667900	M	56	1: Oxali-platina-Irino-tecan-5-FU/FA	Doença Progressiva	(sem resposta)
8-- 30384032	F	67	2: FOLFOX, FOLFIRI	Doença Progressiva	(sem resposta)

9-- 30692441	M	54	2: FOLFOX, FOLFIRI	Doença Progres- siva	(sem resposta)
10-- 30685324	F	65	3: FU/FA, FOLFOX, FOLFIRI	Doença Progres- siva	(sem resposta)

*FOLFOX é uma combinação de 5-fluoruracil, leucovorin e oxaliplatina.

**FOLFIRI é uma combinação de 5-fluoruracil, leucovorin e irinotecan

5

Desta forma, seis dos dez pacientes responderam positivamente ao tratamento com panitumumab, mostrando ou doença estável ou uma resposta parcial.

Exemplo 2

10

Análise Mutacional de EGFR, PI3K,

RAS E RAF em Amostras de Tumor CRC

15

Antes do início do tratamento com panitumumab discutido no Exemplo 1, amostras de tumor CRC de cada paciente foram fixadas em parafina. Uma seção de 10 microns foi preparada a partir de cada amostra de paciente. As regiões da seção contendo tecido tumoral foram marcadas e o tecido foi extraído com 0,2 M NaOH/1 mM EDTA. As amostras foram neutralizadas subsequentemente com Tris-TE 100mM. Após a extração e neutralização, o DNA de cada amostra foi purificado utilizando-se um kit de purificação PCR (Qiagen) seguindo-se as instruções do fabricante.

20

Iniciadores de PCR específicos para exon e iniciadores de seqüenciamento foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 (Rozen S., Skaletsky H. (2000) *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds.) *Bioin-*

formatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386). Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen™ (Carlsbad, CA). O iniciador de PCR direto para exon 18 de EGFr foi GCTGAGGTGACCCTTGTCTC (SEQ ID No.: 1), o iniciador reverso de PCR para o exon 18 de EGFr foi ACAGCTTGCAAGGACTCTGG (SEQ ID No.: 2) e o iniciador de seqüenciamento para o exon 18 de EGFr foi TGGAGCCTCTTACACCCAGT (SEQ ID No.: 3). O iniciador direto de PCR para o exon 19 de EGFr foi CCCAGTGTCCCTCACCTTC (SEQ ID NO: 4), iniciador reverso de PCR para o exon 19 de EGFr foi CCACACAGCAAAGCAGAAAC (SEQ ID No.: 5) e o iniciador de seqüenciamento para o exon 19 de EGFr foi GCTGGTAACATCCACCCAGA (SEQ ID No.: 6). O iniciador direto de PCR para o exon 21 de EGFr foi TGATCTGTCCCTCACAGCAG (SEQ ID No.: 7), iniciador reverso de PCR para o exon 21 de EGFr foi TCAGGAAAATGCTGGCTGAC (SEQ ID No.: 8) e o iniciador de seqüenciamento para o exon 21 de EGFr foi TTCAGGG-CATGAACTACTTGG (SEQ ID No.: 9). O iniciador direto de PCR para o exon 9 de PI3K foi GGGAAAAATATGACAAAGAAAGC (SEQ ID No.: 10), o iniciador reverso de PCR para o exon 9 de PI3K foi CTGAGATCAGCCAA-ATTCAGTT (SEQ ID No.: 11) e o iniciador de seqüenciamento para o exon 9 de PI3K foi TAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAA (SEQ ID No.: 12). O iniciador direto de PCR para o exon 20 de PI3K foi CTCAATGATGCTTGGCTCTG (SEQ ID No.: 13), o iniciador reverso de PCR para o exon 20 de PI3K foi TGGAATCCAGAGTGAGCTTTC (SEQ ID No.: 14) e o iniciador de seqüenciamento para o exon 20 de PI3K foi TTGATGACATTGCATACATTTCG (SEQ ID No: 15). O iniciador direto de PCR para o exon 2 de Ras foi GGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAAC (SEQ ID No.: 16), o iniciador reverso de PCR para o exon 2 de Ras foi AGAATGGTCCTGCACCAGTAA (SEQ ID No.: 17) e o iniciador de seqüenciamento para o exon 2 de Ras foi TCATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTG (SEQ ID No.: 18). O iniciador direto de PCR para o exon 15 de B-Raf foi TGCTTGCTCTGA-

TAGGAAAATG (SEQ ID No.: 19), o iniciador reverso de PCR para o exon q5 de B-Raf foi AGCATCTCAGGGCCAAAAT (SEQ ID No.: 20) e o iniciador de seqüenciamento para o exon 15 de B-Raf foi TGTTTTTCCTT-TACTTACTACACCTCA (SEQ ID No.: 21).

5 Os exons 18, 19 e 21 de EGFr, exons 9 e 20 de PI3K, exon 2 de Ras e exon 15 de B-Raf foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico do tumor purificado utilizando-se os iniciadores de PCR descritos acima. O PCR foi realizado em um volume total de 20 µl utilizando-se um programa PCR “touchdown”. O programa de amplifi-
10 cação foi como se segue: 94°C por 2 minutos; três ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos, 70°C por 30 segundos; três ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 70°C por 30 segundos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 70°C por 30 segundos; e um ciclo de 70°C por 5 minutos. Após a reação estar
15 completa, os amplificados foram purificados utilizando-se o sistema de purificação AMPure PCR (Agencourt Bioscience Corp.). Os amplificados purificados foram seqüenciados utilizando-se o kit BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) de acordo com as instru-
ções do fabricante e analisados com um sistema de eletroforese capilar
20 3730 ABI. Cada seqüência de exon do DNA tumoral de um paciente particular foi comparada com a seqüência do exon selvagem do DNA normal do mesmo paciente para identificar a presença de quaisquer mutações. Os resultados da análise são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2
Análise Mutacional de Alguns Exons
de EGFr, PI3K e Ras em Amostras de Pacientes com CRC

Paciente	EGFr exon 18	EGFr exon 19	EGFr exon 21	PI3K exon 9	PI3K exon 20	Ras exon 2	B-Raf exon 15
1-- 30624793	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
2-- 2350661	WT	WT	WT	WT	WT	G13D	WT
3-- 30640715	WT	WT	WT	WT	WT	G12D	WT
4-- 3039832	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5-- 10015851	WT	WT	WT	WT	WT	G13D	WT
6-- 30656334	WT	WT	WT	WT	WT	G12V	WT
7-- 30667900	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
8-- 30384032	WT	WT	WT	WT	WT	G13D	WT
9-- 30692441	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
10-- 30685324	WT	WT	WT	WT	H1047R	WT	E599V

5 Os resultados nas Tabelas 1 e 2 mostram que as mutações no domínio catalítico de EGFr (exons 18, 19 e 21) e as mutações no exon 1 de Ras, exons 9 e 20 de PI3K e mutações no exon 15 de B-Raf, não estavam correlacionadas com a eficácia do tratamento com panitumumab nos dez pacientes com CRC testados.

10

Exemplo 3

Análise do Número de Cópias de EGFR **e Localização nas Amostras de Tumor CRC**

O número de cópias de um gene de EGFr em amostras de tumor do paciente foi determinado de duas maneiras: por hibridização fluorescente *in situ* ("FISH") e por PCR quantitativa. A análise FISH foi realizada utilizando-se o kit de detecção Her1 FISH (Dakocytomation,

15

Dinamarca) de acordo com as instruções do fabricante. O kit permitiu a rotulagem fluorescente diferencial de cada gene de EGFr, a seqüência alfa-centromérica de cada cromossomo 7 ("CEP7") e cada núcleo presente na amostra. As amostras dos pacientes foram colocadas em
5 uma solução de pré-tratamento (provida no kit) por 30 minutos a 96°C e subsequentemente digeridas com uma solução de pepsina (provida no kit) por 30 minutos a temperatura ambiente. Foram realizados ensaios de FISH de dupla-cor duplo-alvo utilizando-se a sonda LSI EGFR Spectrum Orange (Vysis, Downers Grove, IL) e a sonda CEP7 Spectrum
10 Green (Vysis, Downers Grove, IL). As seções de tecido foram cobertas com 10 µl de solução de sonda (provida no kit) e incubadas a 75°C por 5 minutos para co-desnaturar as sondas de EGFr e de CEP7. As seções foram deixadas hibridizar durante a noite com as sondas desnaturadas a 37°C. As etapas de co-desnaturação e hibridização foram realizadas
15 seqüencialmente em um sistema controlada por microscópio (Hybridizer, Dakocytomation, Dinamarca). Após a hibridização, as seções foram lavadas duas vezes a 65°C por 10 minutos por lavagem utilizando-se o tampão de lavagem provido no kit e secadas a temperatura ambiente por
20 15 minutos. As seções de tecido foram cobertas com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI II, Vysis) para contra-marcação com cromatina e examinadas por microscopia fluorescente.

Um microscópio fluorescente (Zeiss Axioskop, Alemanha) equipado com a estação de trabalho Chromowin (Amplimedical, Itália) foi utilizado para a visualização FISH. O gene de EGFr foi observado
25 como um sinal vermelho com um filtro de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC). A seqüência de CEP7 foi observada como um sinal verde com um filtro de isotiocianato de fluoresceína (FITC). O núcleo celular foi observado como um sinal azul com um filtro DAPI. As imagens representativas de cada espécie foram obtidas com uma câmera
30 Hamamatsu C5895 chilled CCD (Upstate Technical Equipment Co., New

York) em camadas monocromáticas que foram subseqüentemente misturadas pelo programa Casti Imaging FISH Multicolor (Amplimedical). As células do epitélio pigmentoso da retina e células da mucosa colo-retal normais adjacentes às células tumorais em cada amostra de paciente foram utilizadas como controles de célula normal. Células de carcinoma epidermóide humano foram utilizadas como controles para o número aumentado de cópias do gene de EGFr. A espécie do paciente foi disponível apenas como uma seção de 10 micron e, apesar de tentativas múltiplas, a análise FISH não foi conclusiva devido ao excesso de espessura do tecido.

Dois observadores independentes contaram pelo menos 200 núcleos na interfase não sobrepostos de cada amostra utilizando diretrizes de contagem predefinidas. Aos observadores não foi dado conhecer nem as características clínicas dos pacientes nem as contagens e observações do outro observador. No interior de cada núcleo, os números de cópias do gene de EGFr e da seqüência CEP7 foram obtidos independentemente. A proporção do número de cópias do gene de EGFr para o número de núcleos (EGFr:núcleo) e a proporção do número de cópias do gene de EGFr para o número de seqüências CEP7 (EGFr:CEP7) foram registradas. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3
Resultados da Análise FISH do
Número de Cópias do Gene de EGFr

Paciente	Resposta ao panitumumab	Gene EG-FR:CEP7	Gene EG-FR:núcleos
1-- 30624793	resposta parcial	2,50	4,80
2-- 2350661	resposta parcial	2,13	6,80
3-- 30640715	resposta parcial	3,27	8,20
4-- 3039832	resposta parcial	1,19	3,38
5-- 10015851	doença estável	n/a	n/a
6-- 30656334	doença estável	1,04	1,88
7-- 30667900	doença progressiva	0,91	1,70
8-- 30384032	doença progressiva	1,02	2,00
9-- 30692441	doença progressiva	1,03	2,00
10-- 30685324	doença progressiva	1,18	2,10

5

Um gene de EGFr está normalmente localizado no cromossomo 7 e, desta forma, a proporção esperada do número de genes de EGFr:número de seqüências CEP7 era de 1. A proporção esperada do número de genes de EGFr:número de núcleos era de 2, tendo em vista que duas cópias do cromossomo 7 deveriam estar presentes no núcleo. Um número aumentado de cópias do gene de EGFr pode resultar tanto na polissomia do cromossomo 7 quanto da amplificação do gene de EGFr. A dissomia normal é, desta forma, indicada por uma proporção gene de EGFr:CEP7 de 1 e uma proporção gene de EGFr:núcleos de 2. Uma polissomia equilibrada é indicada por uma proporção gene de EGFr:CEP7 de 1 e uma proporção gene de EGFr:núcleos acima de 2. A dissomia normal com amplificação de um gene de EGFr é indicada por

15

uma proporção gene de EGFr:CEP7 acima de 1 e uma proporção gene de EGFr:núcleos acima de 2. O número aumentado de cópias do gene de EGFr foi arbitrariamente definido como um valor ≥ 3 na proporção de número de genes de EGFr:núcleos.

5 A Figura 1 mostra algumas imagens do ensaio de FISH de dupla-cor, nas quais os genes de EGFr aparecem em vermelho e as seqüências CEP7 aparecem em verde. A Figura 1A mostra o padrão de marcação de células de mucosa colo-retal normais, nas quais foi observada uma dissomia equilibrada. A Figura 1B mostra o padrão de
10 marcação de células tumorais do paciente 7, também mostrando dissomia equilibrada. A Figura 1C mostra o padrão de marcação de células tumorais do paciente 4, apresentando polissomia equilibrada. A Figura 1D mostra o padrão de marcação de células tumorais do paciente 1, apresentando dissomia com amplificação do gene de EGFr.

15 O número de cópias do gene de EGFr é também determinado para cada paciente utilizando-se PCR quantitativa. PCR em tempo real é realizada utilizando-se um aparelho ABI PRISM® 7900HT e o sistema de detecção SYBR® Green (Molecular Probes, Inc.) (Applied Biosystems), seguindo-se as instruções do fabricante. O iniciador direto
20 GAATTCGGATGCAGAGCTTC (SEQ ID No.: 22) e o iniciador reverso GACATGCTGCGGTGTTTTTC (SEQ ID No.: 23) são utilizados para amplificar uma região pequena (100-200 bp) não repetitiva de um gene de EGFr. Linhagem 1, um elemento repetitivo para o qual os números de cópias por genoma diplóide são semelhantes em todos as células
25 humanas, é também amplificada a partir da amostra de cada paciente para permitir a normalização dos resultados do gene de EGFr. Os iniciadores direto e reverso para o elemento repetitivo da Linhagem 1 são AAAGCCGCTCAACTACATGG (SEQ ID No.: 24) e TGCTTTGATGCGTCCCAGAG (SEQ ID No.: 25), respectivamente. As condições de
30 amplificação são como se segue: um ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido

de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. O número de ciclos limite são obtidos utilizando-se o programa ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System. As reações de amplificação são realizadas em triplicata e o número de ciclos limite são a média. As alterações do número de cópias são calculadas utilizando-se a fórmula $s^{(Dt-Dlinhagem)-(Nt-Nlinhagem)}$. Nesta fórmula, Dt é a média do número de ciclos limite observado para a seqüência do gene de EGFr em uma amostra do paciente, Dlinhagem é a média do número de ciclos limite observado para a seqüência da Linhagem 1 em uma amostra do paciente, Nt é o número de ciclos limite observado para a seqüência do gene de EGFr em DNA de células do epitélio pigmentoso da retina (“RPE”) e Nlinhagem é o número de ciclos limite observado para a seqüência da Linhagem 1 em DNA de células RPE.

Exemplo 4

15 Ensaio de Inibição da Proliferação Celular

Foi estudado o efeito do panitumumab sobre linhagens celulares com um número normal de cópias do gene de EGFr ou com um número aumentado de cópias do gene de EGFr. Primeiramente, foi determinado o número de cópias de EGFr em linhagens de células CRC experimentais. Foram estudadas oito linhagens de células CRC: DiFi (Jose Baselga, Vall d’Hebron University, Barcelona, Espanha), DLD-1, HCT-116, HT-29, LoVo, SW48, SW480 e SW620 (todas do ATCC). Foi determinado o número de cópias de EGFr de cada linhagem de células CRC utilizando-se a metodologia FISH conforme descrito no Exemplo 3 acima. Cada linhagem de célula (com exceção das células DiFi) foram crescidas em DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina e estreptomicina. As células DiFi foram crescidas em meio F-12 suplementado com FCS 10% e antibióticos. Uma imagem de marcação fluorescente FISH típica para células DiFi é mostrada na Figura 2B. Os valores obtidos das análises FISH são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4
Número de Cópias do Gene EGFr
em Linhagens de Células CRC

Linhagem Celular	Gene EGFr:CEP7	Gene EGFr:Núcleos
DiFi	>20	>20
SW48	1,10	3,19
SW480	0,94	3,08
SW620	1,05	3,00
HT-29	0,97	2,52
LoVo	0,98	2,41
HCT-116	0,93	1,79
DLD-1	0,93	1,68

5

Como mostrado na Tabela 4, as células DiFi apresentam um número de cópias do gene de EGFr muito alto.

A expressão do gene de EGFr foi examinada em cada uma das linhagens de células por análise Western blot da proteína EGFr celular (ver Figura 2A). Os extratos de proteína foram submetidos a eletroforese via SDS-PAGE e transferidos para membranas de difluoreto de polivinilideno por marcação a úmido de alta intensidade. Os filtros foram sondados com os anticorpos indicados e a ligação específica foi detectada utilizando-se um sistema de quimioluminescência amplificado (Amersham). Conforme esperado a partir dos dados de FISH, acima, as células DiFi apresentaram alto nível da proteína EGFr. Com exceção da SW620, as outras linhagens de células mostraram níveis variáveis de proteína EGFr. As células SW260 não continham proteína EGFr, apesar do alto número de cópias do gene de EGFr.

20

O efeito do panitumumab sobre a proliferação de cada uma

das linhagens de células de tumor CRC é determinado utilizando-se um ensaio de incorporação de bromodesoxiuridina (“BrdU”). As células são crescidas em DMEM suplementado com FBS 2% em placas escuras de 96 poços (Culture Plate™ 96F (Packard Bioscience)). As células plaqueadas são incubadas por 5 dias com concentrações variáveis entre 0,01-100 nM de panitumumab (Amgen Inc.). A proliferação celular é determinada por um método ELISA quimioluminescente para ensaio de incorporação de BrdU (Roche). A densidade de semeadura de célula por poço para cada linhagem de célula é como se segue: DiFi: 4000; LoVo: 4000; DLD: 500; HCT116: 1000; HT29: 1000; SW480: 1000; SW387: 4000; SW48: 500; e SW620: 500. O ensaio BrdU é realizado em três experimentos com triplicatas separadas de acordo com as instruções do fabricante e é finalizado 20 horas após a adição da solução de rotulagem. A porcentagem de proliferação celular a cada concentração de panitumumab é calculada utilizando-se a seguinte fórmula: [(amostra teste – amostra branco)/(amostra controle – amostra branco) x 100], onde a amostra de controle são células crescidas em meio sem panitumumab e a amostra em branco consiste em células crescidas em Triton X 0,02% em DMEM (isto é, sem crescimento).

Listagem de Seqüência

<110> Amgen Inc.
Siena, Salvatore
Moroni, Mauro
Bardelli, Alberto

<120> Número de Cópia de Gene do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

<130> 6843.106-304

<150> 60/667,827

<151> 2005-04-01

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador de oligonucleotídio

<400> 1

gctgaggtga ccctgtctc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador de oligonucleotídio

<400> 2

acagcttgca aggactctgg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador de oligonucleotídio

<400> 3

tggagcctct tacaccagct

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador de oligonucleotídio

<400> 4
 cccagtgccc ctcaccttc 19

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

<400> 5
 ccacacagca aagcagaaac 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

<400> 6
 gctggtaaca tccacccaga 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

<400> 7
 tgatctgtcc ctcacagcag 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

<400> 8
 tcaggaaaat gctggctgac 20

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

<400> 9 ttcagggcat gaactacttg g	21
<210> 10 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> iniciador de oligonucleotídio	
<400> 10 gggaaaaata tgacaaagaa agc	23
<210> 11 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> iniciador de oligonucleotídio	
<400> 11 ctgagatcag ccaattcag tt	22
<210> 12 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> iniciador de oligonucleotídio	
<400> 12 tagctagaga caatgaatta agggaaa	27
<210> 13 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> iniciador de oligonucleotídio	
<400> 13 ctcaatgatg cttggctctg	20
<210> 14 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> iniciador de oligonucleotídio	
<400> 14	

	4	21
tggaatccag agtgagcttt c		
<210> 15		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> iniciador de oligonucleotidio		
<400> 15		
ttgatgacat tgcatcatt cg		22
<210> 16		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> iniciador de oligonucleotidio		
<400> 16		
ggtggagtat ttgatagtgt attaac		26
<210> 17		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> iniciador de oligonucleotidio		
<400> 17		
agaatggtcc tgcaccagta a		21
<210> 18		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> iniciador de oligonucleotidio		
<400> 18		
tcattatttt tattataagg cctgctg		27
<210> 19		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> iniciador de oligonucleotidio		
<400> 19		
tgcttgctct gataggaaaa tg		22

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

 <400> 20
 agcatctcag ggccaaaaat 20

<210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

 <400> 21
 tgttttcctt tacttactac acctca 26

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

 <400> 22
 gaattcggat gcagagcttc 20

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

 <400> 23
 gacatgctgc ggtgttttc 19

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador de oligonucleotidio

 <400> 24
 aaagccgctc aactacatgg 20

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador de oligonucleotidio

<400> 25
tgcttgaat gcgtcccaga g

21

“Métodos de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de Tratamento do Mesmo e de Determinação da Eficácia de Tratamento em Paciente”

5

Reivindicações

1 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, caracterizado por que compreende determinar o número de cópia de gene de EGFr numa amostra a partir do sujeito, em que a presença de um número de cópia de gene de EGFr aumentado na amostra prediz que um tratamento de agente de ligação específica a EGFr será eficaz para tratar um câncer relacionado com EGFr no sujeito.

10

2 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 1 , **caracterizado** por que o tratamento de agente de ligação específica a EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr.

15

3 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 2 , **caracterizado** por que o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo anti-EGFr humano.

20

4 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 3 , **caracterizado** por que o anticorpo anti-EGFr humano é o panitumumabe.

25

5 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 1 , **caracterizado** por que o tratamento de agente de ligação específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterápico.

30

6 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 1 , **caracterizado** por que o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido.

5 **7 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito**, de acordo com a Reivindicação 6 , **caracterizado** por que o tumor sólido é pelo menos um câncer selecionado a partir de câncer coloretal, câncer do pulmão, câncer de mama, câncer do ovário, cânc
10 cer da próstata, câncer do rim e câncer de cabeça e pescoço.

8 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 1 , **caracterizado** por que determinar o número de cópia de gene de EGFr na amostra compre
15 ende comparar o número de cópia de gene de EGFr na amostra com o número de cópia de gene de EGFr numa amostra de referência normal.

9 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 8 , **caracterizado** por
20 que determinar o número de cópia de gene de EGFr compreende a análise fluorescente de hibridação *in situ*.

10 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 8 , **caracterizado** por
25 que determinar o número de cópia de gene de EGFr compreende a análise quantitativa de PCR.

11 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 8 , **caracterizado** por
30 que determinar o número de cópia de gene de EGFr compreende a análise de borrão de Southern.

12 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 1 , **caracterizado** por que determinar o número de cópia de gene de EGFr compreende:

5 (a) determinar o número de cópia de gene de EGFr numa amostra de teste a partir de um tumor no sujeito;

(b) determinar o número de cópia de pelo menos uma seqüência de nucleotídios de referência na amostra de teste; e

10 (c) comparar o número de cópia de gene de EGFr com pelo menos um número de cópia de seqüência de nucleotídios de referência, em que um número de cópia aumentado do gene de EGFr na amostra de teste em relação ao número de cópia de pelo menos uma seqüência de nucleotídios de referência prediz que um tratamento de agente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de câncer relacionado com
15 EGFr no sujeito.

13 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 12, **caracterizado** por que pelo menos um número de cópia de seqüência de nucleotídios de referência é de duas cópias por célula.
20

14 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 12, **caracterizado** por que pelo menos uma seqüência de nucleotídios de referência é uma seqüência centromérica.
25

15 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 12, **caracterizado** por que determinar o número de cópia de gene de EGFr e pelo menos um
30 número de cópia de seqüência de nucleotídios de referência compreende a análise fluorescente de hibridação *in situ*.

16 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 12, **caracterizado** por que determinar o número de cópia de gene de EGFr e pelo menos um número de cópia de seqüência de nucleotídios de referência compreende a análise quantitativa de PCR.

17 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 12, **caracterizado** por que determinar o número de cópia de gene de EGFr e pelo menos um número de cópia de seqüência de nucleotídios de referência compreende a análise de borrão de Southern.

18 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 12, **caracterizado** por que o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido.

19 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 18, **caracterizado** por que o tumor sólido é pelo menos um câncer selecionado a partir de câncer coloretal, câncer do pulmão, câncer de mama, câncer do ovário, câncer da bexiga, câncer da próstata, câncer do rim e câncer de cabeça e pescoço.

20 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 12, **caracterizado** por que o tratamento de agente de ligação específica a EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr.

21 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 20, **caracterizado**

por que o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo anti-EGFr humano.

22 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 21, **caracterizado** por que o anticorpo anti-EGFr humano é o panitumumabe.

23 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 12, **caracterizado** por que o tratamento de agente de ligação específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterápico.

24 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado com EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que determinar o número de cópia de gene de EGFr compreende:

(a) determinar o número de cópia de gene de EGFr numa amostra de teste a partir do sujeito;

(b) determinar o número de núcleos na amostra de teste;

e

(c) comparar o número de cópia de gene de EGFr com o número de núcleos, em que uma relação maior do que dois prediz que um tratamento de agente de ligação específica a EGFr será eficaz no tratamento de um câncer relacionado com EGFr no sujeito.

25 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado a EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 24, **caracterizado** por que determinar o número de cópia de gene de EGFr e o número de núcleos compreende a análise fluorescente de hibridação *in situ*.

26 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado a EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 24, **caracterizado**

por que o câncer relacionado com EGFr é um tumor sólido.

27 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado a EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 26 , **caracterizado**

5 por que o tumor sólido é pelo menos um câncer selecionado a partir de câncer colorretal, câncer do pulmão, câncer de mama, câncer do ovário, câncer da bexiga, câncer da próstata, câncer do rim e câncer de cabeça e pescoço.

28 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado a EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 24 , **caracterizado**

10 por que o tratamento de agente de ligação específica a EGFr compreende um anticorpo anti-EGFr.

29 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado a EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 28, **caracterizado**

15 por que o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo anti-EGFr humano.

30 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado a EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 29, **caracterizado**

20 por que o anticorpo anti-EGFr humano é o panitumumabe.

31 - Método de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado a EGFr num Sujeito, de acordo com a Reivindicação 24, **caracterizado**

25 por que o tratamento de agente de ligação específica a EGFr compreende um agente de ligação específica a EGFr e pelo menos um agente quimioterápico.

32 - Método de Tratamento de Sujeito com Câncer Relacionado com EGFr, caracterizado por que compreende:

30 (a) determinar o número de cópia de gene de EGFr numa amostra a partir do sujeito;

(b) determinar se existe um número de cópia de gene de EGFr aumentado na amostra; e

(c) se existir um número de cópia de gene de EGFr aumentado na amostra, administrar ao sujeito uma quantidade farmacologicamente efetiva de um agente de ligação específica a EGFr.

33 - Método de Tratamento de Sujeito com Câncer Relacionado com EGFr, de acordo com a Reivindicação 32, **caracterizado** por que o agente de ligação específica a EGFr é um anticorpo anti-EGFr.

34 - Método de Tratamento de Sujeito com Câncer Relacionado com EGFr, de acordo com a Reivindicação 33, **caracterizado** por que o anticorpo anti-EGFr é um anticorpo anti-EGFr humano.

35 - Método de Tratamento de Sujeito com Câncer Relacionado com EGFr, de acordo com a Reivindicação 34, **caracterizado** por que o anticorpo anti-EGFr humano é o panitumumabe.

36 - Método de Tratamento de Sujeito com Câncer Relacionado com EGFr, de acordo com a Reivindicação 32, **caracterizado** por que o agente de ligação específica a EGFr é administrado com pelo menos um agente quimioterápico.

37 - Método de Determinação da Eficácia de Tratamento em Paciente, **caracterizado** por que compreende:

(a) determinar o número de cópia de gene de EGFr numa primeira amostra obtida a partir de um paciente para obter um primeiro nível de número de cópia de gene de EGFr;

(b) administrar o tratamento ao paciente;

(c) determinar o número de cópia de gene de EGFr numa segunda amostra a partir do paciente num momento a seguir à administração do tratamento, gerando, assim, um segundo nível de número de cópia de gene de EGFr copia; e

(d) comparar o primeiro e o segundo níveis de número de gene de cópia de EGFr, em que uma diminuição no número de cópia de ge-

ne de EGFr no segundo nível de número de cópia de gene de EGFr para o primeiro nível de número de cópia de gene de EGFr indica que o tratamento é efetivo no paciente.

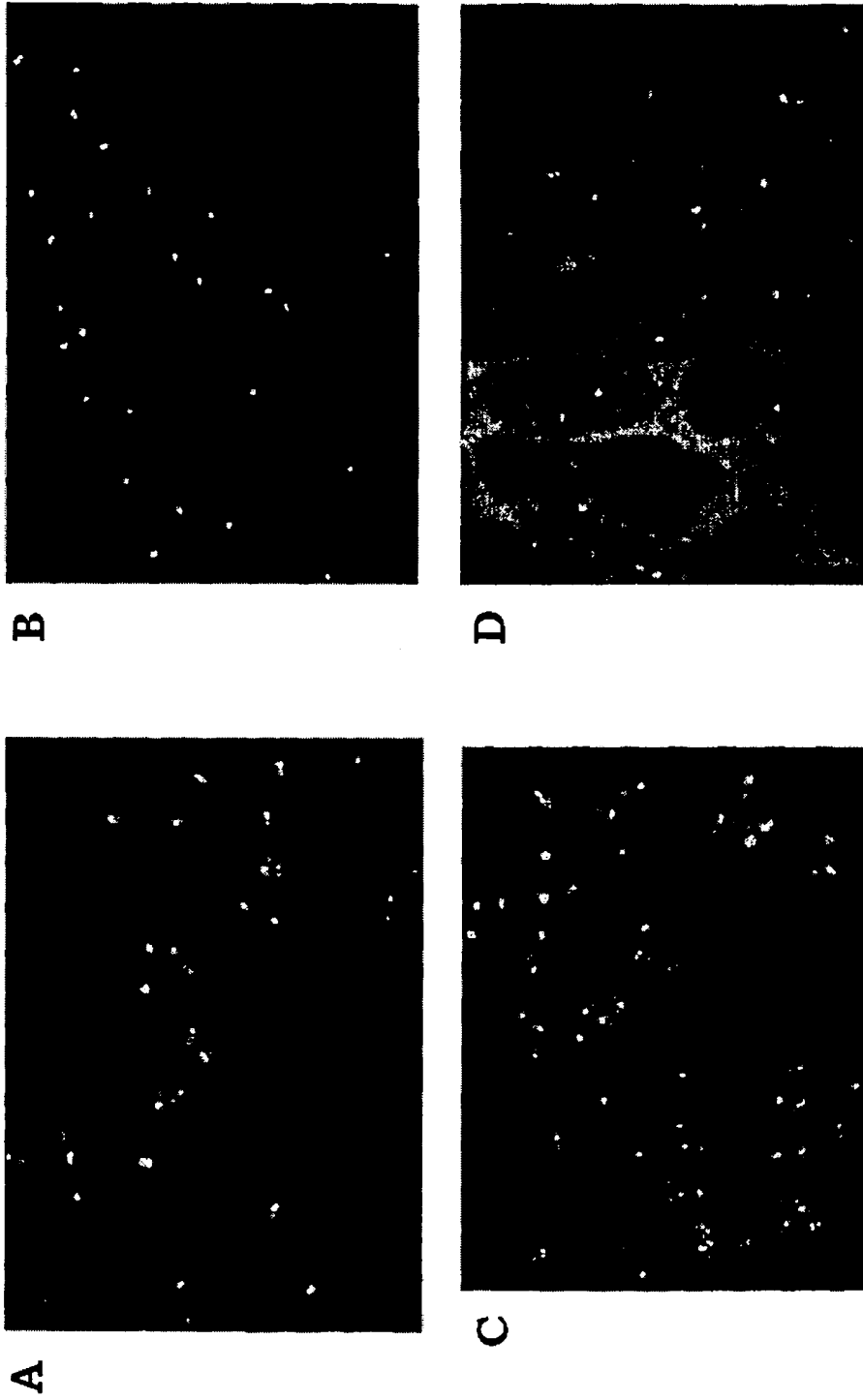
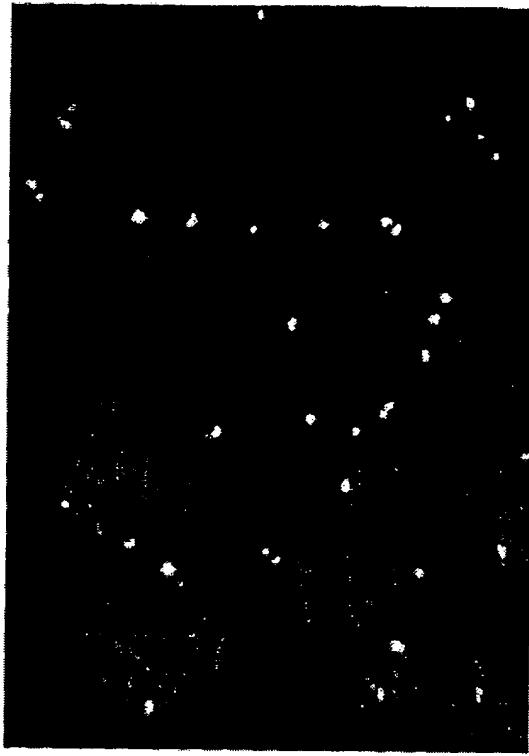
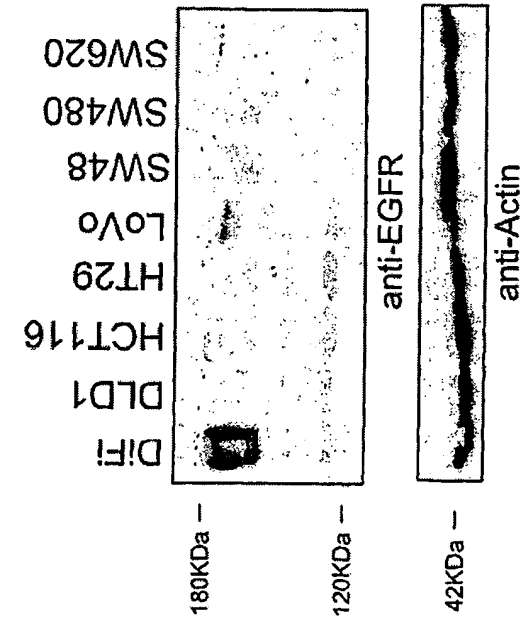


Figure 1



B



A

Figura 2

**“Métodos de Predição da Eficácia de Tratamento de Agente de
Ligação Específica a EGFr em Tratamento de Câncer Relacionado
com EGFr num Sujeito, de Tratamento do Mesmo e de Determinação
da Eficácia de Tratamento em Paciente”**

5

Resumo

São proporcionados métodos de predição sobre se um tratamento de agente de ligação específica a receptor do fator de crescimento anti-epidérmico (“EGFr”) será eficaz no tratamento do câncer e métodos de tratamento de pacientes com agentes de ligação específica a EGFr.