

(57) Resumo: AGENTE DE DETECÇÃO DE CÂNCER GASTROINTESTINAL ErbB3, SEUS USOS, E MÉTODO PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE CÂNCER. A presente invenção refere-se a mutações de ErbB3 somáticas em câncer que inclui métodos para identificar, diagnosticar e prognosticar cânceres de ErbB3, assim como métodos para tratar câncer, que inclui certas subpopulações de pacientes. Agente de detecção de câncer gastrointestinal ErbB3 que compreende um reagente capaz de ligar especificamente a uma mutação ErbB3 em uma sequência de ácido nucleico ErbB3.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**AGENTE DE DETECÇÃO DE CÂNCER GASTROINTESTINAL ErbB3, SEUS USOS, E MÉTODO PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE CÂNCER**".

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade de acordo com 35 U.S.C. §119(e) e o benefício do Pedido Provisório dos Estados Unidos N.º de Série 61/629,951, depositado em 30 de novembro de 2011, o qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a mutações de ErbB3 somáticas em câncer incluindo métodos para identificar, diagnosticar e prognosticar cânceres de ErbB3, assim como métodos para tratar câncer, incluindo certas subpopulações de pacientes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] A família de receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER) de tirosina cinases de receptor (RTK), também conhecida como receptores ERBB, consiste em quatro membros: EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 e ERBB4/HER4 (Hynes et al. Nature Reviews Cancer 5, 341-354 (2005); Baselga et al. Nature Reviews Cancer 9, 463-475 (2009)). Os membros da família ERBB contêm um domínio extracelular (ECD), uma região transmembrana de amplitude simples, um domínio tirosina cinase intracelular e uma cauda de sinalização C-terminal (Burgess et al. Mol Cell 12, 541-552 (2003); Ferguson. Annual Review of Biophysics 37, 353-373 (2008)). O ECD é uma estrutura de quatro domínios consistindo em dois domínios L (I e III) e dois domínios ricos em cisteína (II e IV) (Burgess et al. Mol Cell 12, 541-552 (2003); Ferguson. Annual Review of Biophysics 37, 353-373 (2008)). Os receptores ERBB são ativados pelos múltiplos ligantes que incluem fator de crescimento epidérmico

(EGF), fator de crescimento de transformação- α (TGF- α) e neuregulinas (Yarden et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 127-137 (2001)). A ativação

do receptor envolve uma única molécula de ligante ligando simultaneamente a domínios I e III, levando a heterodimerização ou homodimerização por meio de um braço de dimerização no domínio II (Burgess et al. *Mol Cell* 12, 541-552 (2003); Ogiso et al. *Cell* 110, 775-787 (2002); Cho. *Science* 297, 1330-1333 (2002); Dawson et al. *Molecular and Cellular Biology* 25, 7734-7742 (2005); Alvarado et al. *Cell* 142, 568-579 (2010); Lemmon et al. *Cell* 141, 1117-1134 (2010)). Na ausência de ligante, o braço de dimerização do domínio II é dobrado para fora via uma interação intramolecular com o domínio IV, levando a uma configuração “amarrada”, autoinibida (Burgess et al. *Mol Cell* 12, 541-552 (2003); Cho. *Science* 297, 1330-1333 (2002); Lemmon et al. *Cell* 141, 1117-1134 (2010); Ferguson et al. *Mol Cell* 11, 507-517 (2003)).

[004] Embora os quatro receptores ERBB compartilhem uma organização de domínio similar, estudos funcionais e estruturais mostram que ERBB2 não liga a nenhum dos ligantes da família ERBB conhecidos e está constitutivamente em uma configuração “desamarrada” (aberta) adequada para dimerização (Garrett et al. *Mol Cell* 11, 495-505 (2003). Em contraste, ERBB3, embora capaz de ligação a ligante, heterodimerização e sinalização, tem um domínio cinase impedido (Baselga et al. *Nature Reviews Cancer* 9, 463-475 (2009); Jura et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 21608-21613 (2009); Shi et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 7692-7697 (2010). Embora, ERBB2 e ERBB3 sejam funcionalmente incompletos por si só, seus heterodímeros são potentes ativadores de sinalização celular (Pinkas-Kramarski et al. *The EMBO Journal* 15, 2452-2467 (1996); Tzahar et al. *Molecular and Cellular Biology* 16, 5276-5287 (1996); Holbro et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 8933-8938 (2003)).

[005] Embora os receptores ERBB sejam reguladores críticos de crescimento e desenvolvimento normal, sua desregulação também foi

implicada no desenvolvimento e na progressão de cânceres (Baselga et al. *Nature Reviews Cancer* 9, 463-475 (2009); Sithanandam et al. *Cancer Gene Ther* 15, 413-448 (2008); Hynes et al. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 177-184 (2009)). Em particular, a amplificação de gene levando a superexpressão de receptor e ativando mutações somáticas é conhecida como ocorrendo em ERBB2 e EGFR em vários cânceres (Sithanandam et al. *Cancer Gene Ther* 15, 413-448 (2008); Hynes et al. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 177-184 (2009); Wang et al. *Cancer Cell* 10, 25-38 (2006); Yamauchi et al. *Biomark Med* 3, 139-151 (2009)). Isto levou ao desenvolvimento de múltiplos terapêuticos à base de pequena molécula e anticorpo que têm como alvo EGFR e ERBB2 (Baselga et al. *Nature Reviews Cancer* 9, 463-475 (2009); Alvarez et al. *Journal of Clinical Oncology* 28, 3366-3379 (2010)). Embora o papel preciso de ERBB4 em oncogênese não seja bem estabelecido (Koutras et al. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 74, 73-78 (2010)), a transformação de mutações somáticas em ERBB4 foi reportada em melanoma (Prickett et al. *Nature Genetics* 41, 1127-1132 (2009)). Recentemente, ERBB3 emergiu como um alvo terapêutico de câncer potencial, dado que ele desempenha uma papel importante na sinalização de ERBB2 e é também implicado em promover resistência aos terapêuticos existentes (Baselga et al. *Nature Reviews Cancer* 9, 463-475 (2009); Amin et al. *Semin Cell Dev Biol* 21, 944-950 (2010)). Embora a amplificação e/ou superexpressão de ERBB3 seja conhecida em alguns cânceres, somente a ocorrência esporádica de mutações somáticas de ERBB3 foi reportada, embora a relevância funcional destas mutações não tenha sido estudada. A invenção fornecida neste documento envolve a identificação de mutações somáticas ERBB3 frequentes em cânceres humanos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção é baseada pelo menos em parte na

descoberta de eventos mutacionais somáticos múltiplos no receptor ERBB3 da família do receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER) de tirosina cinases de receptor (RTK), que estão associados com vários tumores humanos incluindo, sem limitação, tumores gástricos e de cólon. Acredita-se que estas mutações predisõem e/ou contribuem diretamente para tumorigênese humana. De fato, como descrito neste documento, há evidência que algumas das mutações promovem oncogenese *in vivo*.

[007] Em um aspecto, a presente invenção proporciona agentes de detecção de câncer ErbB3. Em uma modalidade, o agente de detecção de câncer ErbB3 é um agente de detecção de câncer gastrointestinal ErbB3. Em outra modalidade, o agente de detecção compreende um reagente capaz de ligar especificamente a uma mutação ErbB3 em uma sequência de ácido nucleico ErbB3. Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico ErbB3 compreende SEQ ID NO:3 ou 1.

[008] Em algumas modalidades, o reagente compreende um polinucleotídeo de fórmula

[009] $5' \quad X_a-Y-Z_b \quad 3'$ Fórmula I,

[0010] em que

[0011] X é um ácido nucleico e a está entre cerca de 0 e cerca de 250;

[0012] Y é um códon de mutação ErbB3; e

[0013] Z é um ácido nucleico e b está entre cerca de 0 e cerca de 250.

[0014] Em outra modalidade, o códon de mutação codifica (i) um aminoácido em uma posição de SEQ ID NO:2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089 e 1164; ou (ii) um códon de parada na posição 193. Em outra modalidade, o câncer gastrointestinal é câncer gás-

trico ou câncer de cólon.

[0015] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para determinar a presença de câncer gastrointestinal ErbB3 em um indivíduo. Em uma modalidade, o método compreende detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo uma mutação em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição da sequência de aminoácido ErbB3 e em que a mutação é indicativa de um câncer gastrointestinal ErbB3 no indivíduo. Em outra modalidade, a mutação resultante em uma mudança de aminoácido é em uma posição de SEQ ID NO:2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089, 1164 e 193. Em outra modalidade, o câncer gastrointestinal é câncer gástrico ou câncer de cólon.

[0016] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para determinar a presença de câncer gastrointestinal ErbB3 em um indivíduo. Em uma modalidade, o método compreende detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo a presença ou ausência de uma mutação de aminoácido em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição em SEQ ID NO: 2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089, 1164, 193, 492 e 714, e em que a presença da mutação é indicativa de um câncer ErbB3 no indivíduo. Em outra modalidade, o câncer de ErbB3 é selecionado do grupo consistindo em gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma escomoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), pulmão e pancreático.

[0017] Em ainda outro aspecto, os métodos de determinação ainda compreendem uma das seguintes etapas adicionais: administrar um agente terapêutico ao dito indivíduo, identificar o indivíduo em necessidade, obter a amostra de um indivíduo em necessidade, ou qualquer combinação das mesmas. Em uma modalidade, o agente terapêutico é um inibidor de ErbB. Em outras modalidades, o inibidor de ErbB é selecionado do grupo consistindo em um antagonista de EGFR, um antagonista de ErbB2, um antagonista de ErbB3, um antagonista de ErbB4 e um antagonista de EGFR/ErbB3. Em outra modalidade, o inibidor é um inibidor de molécula pequena. Em uma modalidade, o antagonista é um anticorpo antagonista. Em ainda outra modalidade, o anticorpo é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo biespecífico, um anticorpo quimérico, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado e um fragmento de anticorpo.

[0018] Em outro aspecto, a etapa de detecção compreende amplificação ou sequenciamento. Em uma modalidade, a detecção compreende amplificar ou sequenciar a mutação e detectar a mutação ou sequência da mesma. Em outra modalidade, a amplificação compreende misturar um iniciador de amplificação ou par de iniciadores de amplificação com um gabarito de ácido nucleico isolado da amostra. Em outras modalidades, o iniciador ou par de iniciadores é complementar ou parcialmente complementar a uma região proximal a ou incluindo a dita mutação, e é capaz de iniciar polimerização de ácido nucleico por uma polimerase no gabarito de ácido nucleico. Em outra modalidade, a amplificação compreende ainda estender o iniciador ou par de iniciadores em uma reação de polimerização de DNA compreendendo uma polimerase e o ácido nucleico de gabarito para gerar um amplicon. Em outra modalidade, na amplificação ou no sequenciamento, a mutação é detectada por um processo que inclui uma ou mais de: sequenciar a mutação em um DNA genômico isolado da amostra biológica, hibridi-

zar a mutação ou um amplicon da mesma para uma matriz, digerir a mutação ou um amplicon da mesma com uma enzima de restrição ou amplificação de PCR em tempo real da mutação. Em ainda outra modalidade, a amplificação ou o sequenciamento compreende ainda sequenciar parcialmente ou totalmente a mutação em um ácido nucleico isolado da amostra biológica. Em outras modalidades, a amplificação compreende realizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR), transcriptase reversa PCR (RT-PCR) ou reação em cadeia da ligase (LCR) usando um ácido nucleico isolado da amostra biológica como um gabarito na PCR, RT-PCR ou LCR.

[0019] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para tratar câncer gastrointestinal em um indivíduo em necessidade. Em uma modalidade, o método compreende a) detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo uma mutação em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição da sequência de aminoácido ErbB3 e em que a mutação é indicativa de um câncer gastrointestinal ErbB3 no indivíduo. Em outra modalidade, o método ainda compreende b) administrar um agente terapêutico ao dito indivíduo. Em outras modalidades, a mutação resultante em uma mudança de aminoácido é em uma posição de SEQ ID NO:2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089, 1164 e 193. Em outra modalidade, o câncer gastrointestinal é câncer gástrico ou câncer de cólon.

[0020] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para tratar um câncer ErbB3 em um indivíduo. Em uma modalidade, o método compreende a) detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo a presença ou ausência de uma mutação de aminoácido em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos

uma posição em SEQ ID NO: 2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089, 1164, 193, 492 e 714, e em que a presença da mutação é indicativa de um câncer ErbB3 no indivíduo. Em outra modalidade, o método ainda compreende b) administrar um agente terapêutico ao dito indivíduo. Em algumas modalidades, o câncer de ErbB3 é selecionado do grupo consistindo em gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, colorretal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma escamoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), pulmão e pancreático.

[0021] Em outro aspecto, os métodos de tratamento envolvem inibidores ErbB3. Em uma modalidade adicional, o agente terapêutico é um inibidor de ErbB. Em outra modalidade, o inibidor de ErbB é selecionado do grupo consistindo em um antagonista de EGFR, um antagonista de ErbB2, um antagonista de ErbB3, um antagonista de ErbB4 e um antagonista de EGFR/ErbB3. Em ainda outra modalidade, o inibidor é um inibidor de molécula pequena. Em uma modalidade, o antagonista é um anticorpo antagonista. Em outras modalidades, o anticorpo é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo biespecífico, um anticorpo quimérico, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado e um fragmento de anticorpo.

Modalidades adicionais

[0022] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos para determinar a presença de câncer ErbB3 em um indivíduo em necessidade. Em uma modalidade, o método compreende a etapa de detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo a presença ou ausência de uma mutação de aminoácido em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição selecionada do

grupo consistindo em M60, R193, A232, P262, V295, G325, M406, D492, V714, Q809, R1089, T1164. Em outra modalidade, o método ainda compreende administrar um agente terapêutico ao indivíduo. Em outra modalidade, o método ainda compreende identificar o indivíduo em necessidade. Em ainda outra modalidade, o método ainda compreende obter a amostra de um indivíduo em necessidade. Em outra modalidade, o câncer de ErbB3 é selecionado do grupo consistindo em gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma escamoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), pulmão e pancreático.

[0023] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos para determinar a presença de câncer gastrointestinal ErbB3 em um indivíduo em necessidade compreendendo detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo uma mutação em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição selecionada do grupo consistindo em V104, Y111, A232, P262, G284, T389 e Q809. Em outra modalidade, o método ainda compreende administrar um agente terapêutico ao indivíduo. Em outra modalidade, o método ainda compreende identificar o indivíduo em necessidade. Em ainda outra modalidade, o método ainda compreende obter a amostra de um indivíduo em necessidade. Em outra modalidade, o câncer gastrointestinal ErbB3 é câncer gástrico ou câncer de cólon.

[0024] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos para identificar câncer gastrointestinal ErbB3 em um indivíduo em necessidade que é provável de responder a antagonista de ErbB, o dito método compreendendo detectar em uma célula de câncer gastrointestinal obtida do indivíduo uma mutação em uma sequência de áci-

do nucleico codificando ErbB3, em que a mutação em pelo menos uma posição selecionada do grupo consistindo em V104, Y111, A232, P262, G284, T389 e Q809. Em outra modalidade, o método ainda compreende administrar um agente terapêutico ao indivíduo. Em outra modalidade, o método ainda compreende obter a amostra de um indivíduo em necessidade. Em outra modalidade, o câncer gastrointestinal ErbB3 é câncer gástrico ou câncer de cólon.

[0025] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos para tratar câncer ErbB3 em um indivíduo em necessidade. Em uma modalidade, o método compreende a etapa de detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo a presença ou ausência de uma mutação de aminoácido em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição selecionada do grupo consistindo em M60, R193, A232, P262, V295, G325, M406, D492, V714, Q809, R1089, T1164. Em outra modalidade, o método ainda compreende a etapa de administrar um agente terapêutico ao dito indivíduo.

[0026] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos para tratar câncer gastrointestinal ErbB3 em um indivíduo em necessidade. Em uma modalidade, o método compreende a etapa de detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo uma mutação em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição selecionada do grupo consistindo em V104, Y111, A232, P262, G284, T389 e Q809. Em outra modalidade, o método ainda compreende a etapa de administrar um agente terapêutico ao dito indivíduo.

[0027] Em uma modalidade, o agente terapêutico administrado nos métodos da presente invenção é um inibidor de ErbB. Em outra modalidade, o inibidor de ErbB é selecionado do grupo consistindo em

um antagonista de EGFR, um antagonista de ErbB2, um antagonista de ErbB3, um antagonista de ErbB4 e um antagonista de EGFR/ErbB3. Em outra modalidade, o inibidor é um inibidor de molécula pequena. Em algumas modalidades, o inibidor de ErbB é antagonista de EGFR. Em outras modalidades, o inibidor de ErbB é um antagonista de ErbB2. Em outra modalidade, o inibidor de ErbB é um antagonista de ErbB3. Em outra modalidade, o inibidor de ErbB é um antagonista de ErbB4. Em algumas modalidades, o inibidor de ErbB é um antagonista de EGFR/ErbB3. Em outras modalidades, o antagonista é um anticorpo antagonista. Em algumas modalidades, o anticorpo é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo biespecífico, um anticorpo quimérico, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado e um fragmento de anticorpo.

[0028] Em outro aspecto, os métodos da presente invenção compreende uma etapa de detecção na qual a sequência de ácido nucleico obtida da amostra é analisada para a presença ou ausência da(s) mutação(ões). Em uma modalidade, a detecção compreende amplificar ou sequenciar a mutação e detectar a mutação ou sequência da mesma. Em outra modalidade, a amplificação compreende misturar um iniciador de amplificação ou par de iniciadores de amplificação com um gabarito de ácido nucleico isolado da amostra. Em outra modalidade, o iniciador ou par de iniciadores é complementar ou parcialmente complementar a uma região proximal a ou incluindo a dita mutação, e é capaz de iniciar polimerização de ácido nucleico por uma polimerase no gabarito de ácido nucleico. Em ainda outra modalidade, o método ainda compreende estender o iniciador ou par de iniciadores em uma reação de polimerização de DNA compreendendo uma polimerase e o ácido nucleico de gabarito para gerar um amplicon. Em algumas modalidades, a mutação é detectada por um processo que inclui uma ou mais de: sequenciar a mutação em um DNA genômico isolado da a-

mostra biológica, hibridizar a mutação ou um amplicon da mesma para uma matriz, digerir a mutação ou um amplicon da mesma com uma enzima de restrição ou amplificação de PCR em tempo real da mutação. Em outras modalidades, o método compreende sequenciar parcialmente ou totalmente a mutação em um ácido nucleico isolado da amostra biológica. Em uma modalidade, a amplificação compreende realizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR), transcriptase reversa PCR (RT-PCR) ou reação em cadeia da ligase (LCR) usando um ácido nucleico isolado da amostra biológica como um gabarito na PCR, RT-PCR ou LCR.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0029] arquivo desta patente contém pelo menos um desenho executado em cores. Cópias desta patente com desenho(s) em cores serão fornecidas pelo Escritório de Patentes e Marcas mediante solicitação e pagamento das taxas necessárias.

[0030] Figura 1. Amostras Proporciona uma lista das amostras de tecido humano no estudo de ERBB3 em cânceres humanos.

[0031] Figura 2. Sequência de ácido nucleico ERBB3 tipo selvagem representativa (N.º de Acesso NM_001982) (SEQ ID NO: 1).

[0032] Figura 3. Sequência de ácido nucleico ERBB3 tipo selvagem representativa (N.º de Acesso NP_001973) (SEQ ID NO: 2).

[0033] Figura 4 (a-f). Mutações somáticas ERBB3. (a-b) Alterações de proteína resultantes de mutações somáticas ERBB3 mapeadas sobre os domínios de proteína ERBB3 são mostradas. Mutações hotspot representadas como mudanças de aminoácido repetitivas em um fundo vermelho claro. A altura da barra vertical de fundo em torno do resíduo mutado é proporcional à frequência de mutação nessa posição particular. (c-d) mutações somáticas não sinônimas ERBB3 (triângulos invertidos; triângulos vermelhos representam hotspots) representadas sobre domínios de proteína ERBB3. O histograma no topo representa

contagem de mutações em cada posição detectada observada em amostras neste estudo e outros estudos publicados (barras vermelhas indicam mutações hotspot e barras azuis representam mutantes não hotspot adicionais testados para atividade). (e-f) Vista expandida e suplementada da Figura 4 (a-b). Figura 4 (a-f) fornece uma vista linear de ErbB3 onde as Figuras 4a, c e e mostram uma metade N-terminal e as Figuras 4b, d e f mostram uma metade C-terminal.

[0034] Figura 5. Expressão de mutantes ERBB3 (A,B) e expressão de ERBB2 (B) nas amostras de cólon mutante ERBB3 como avaliada usando dados RNA-seq (Seshagiri, S. *et al.* Comprehensive analysis of colon cancer genomes identifies recurrent mutations and R-spondin fusions. (*Manuscript in Preparation* 2011)).

[0035] Figura 6. Ortólogos ERBB3 de alinhamento de sequência múltipla representando conservação através de sítios mutados. *H. sapiens* (NP_001973.2 (sequência de comprimento total é divulgada como SEQ ID NO: 126 e as várias regiões são divulgadas como SEQ ID NOS 132-151, respectivamente, em ordem de aparição)), *P. troglodytes* (XP_509131.2 (sequência de comprimento total é divulgada como SEQ ID NO: 130 e as várias regiões são divulgadas como SEQ ID NOS 212-229, respectivamente, em ordem de aparição)), *C. lupus* (XP_538226.2 (SEQ ID NO: 131)), *B.taurus* (NP_001096575.1 (sequência de comprimento total é divulgada como SEQ ID NO: 129 e as várias regiões são divulgadas como SEQ ID NOS 192-211, respectivamente, em ordem de aparição)), *M.musculus* (NP_034283.1 (sequência de comprimento total é divulgada como SEQ ID NO: 127 e as várias regiões são divulgadas como SEQ ID NOS 152-171, respectivamente, em ordem de aparição)) e *R.norvegicus* (NP_058914.2 (sequência de comprimento total é divulgada como SEQ ID NO: 128 e as várias regiões são divulgadas como SEQ ID NOS 172-191, respectivamente, em ordem de aparição)) foram alinhados usando Clustal W

(Larkin, M. A. *et al. Bioinformatics (Oxford, England)* **23**, 2947-2948 (2007)). Resíduos mutados são mostrados em um fundo oval vermelho.

[0036] Figura 7. Mutações ECD somáticas frequentes (ou hotspot), mostradas em vermelho, mapeadas em (A) uma estrutura cristal de ERBB3 ECD "amarrado" [pdb 1M6B] (B), ou (B) em um modelo de heterodímero ERBB3/ERBB2 ECD "desamarrado" com base em dímero EGFR ECD (pdb 1IVO) usando ERBB3 [pdb 1M6B] e ERBB2 [pdb 1N8Z]. O ligante ERBB3 mostrado como uma superfície cinza com base em EGF [pdb 1IVO] (C). Mutações somáticas de domínio de cinase ERBB3 mostradas em vermelho mapeadas em uma estrutura do domínio de cinase ERBB3 [pdb 3LMG]. * = códon de parada.

[0037] Figura 8. Mutações somáticas ERBB3 mapeadas na estrutura de cristal ECD de ERBB3 (pdb 1M6B) colorida pelo domínio.

[0038] Figura 9. Mutantes ERBB3 suportam proliferação independente de EGF de células MCF10A em cultura 3D. Células MCF10A expressando estavelmente mutantes ERBB3 ou sozinhos ou juntos com cada um de EGFR ou ERBB2 mostram proliferação independente de EGF. Estudos envolvendo MCF10A foram realizados na ausência de soro, EGF e NRG1. EV – vetor vazio.

[0039] Figura 10. Mutantes ERBB3 promovem EGF e crescimento independente de ancoragem independente de soro. Imagem representativa representando colônias formadas por MCF10A expressando ERBB3 ou sozinho ou em combinação com EGFR ou ERBB2 é mostrada (a). Quantificação das colônias doensaio representado em (a) é mostrada para mutantes ERBB3 em combinação com EGFR (b) ou ERBB2 (c).

[0040] Figura 11. Células MCF10A expressando estavelmente mutantes ERBB3 ou sozinhos (A) ou juntos com cada um de EGFR (B) ou ERBB2 (C) mostram sinalização a jusante elevada quando avaliadas

por western blot. Estudos envolvendo MCF10A foram realizados na ausência de soro, EGF e NRG1. EV – vetor vazio.

[0041] Figura 12. Mutantes ERBB3 suportam proliferação independente de EGF de células MCF10A em cultura 3D. Células MCF10A expressando estavelmente mutantes ERBB3 ou sozinhos ou juntos com EGFR ou ERBB2 mostram grande arquitetura acinar, elevada coloração Ki67 e elevado índice de migração em comparação com ERBB3/ ERBB2 expressando células MCF10A. Dados representam média \pm SEM de três experimentos independentes. Estudos envolvendo MCF10A foram realizados na ausência de soro, EGF e NRG1. EV – vetor vazio.

[0042] Figuras 13A (a-b) mostram imagens representativas de células MCF10A expressando os mutantes ERBB3 indicados junto com ERBB2 em seguida a migração de um transpoço no ensaio de migração (a) e quantificação deste efeito de migração (b).

[0043] Figuras 13B (a-e) mostram que mutantes ERBB3 suportam crescimento independente de ancoragem de células epiteliais colônicas IMCE. Células epiteliais colônicas IMCE expressando ou ERBB3 por si só ou em combinação com ERBB2 mostraram crescimento independente de ancoragem (a), elevado número de colônias (b), elevada fosfo sinalização (c, d) e crescimento in vivo (e) em comparação com ERBB3-WT/ERBB2 expressando células IMCE. EV – vetor vazio.

[0044] Figura 14. Mutantes ERBB3 transformam e promovem sobrevivência independente de IL3 de células BaF3. Células BaF3 expressando estavelmente mutantes ERBB3 ou sozinhos ou juntos com cada um de EGFR ou ERBB2 promove sobrevivência independente de IL3. Estudos BaF3 foram realizados na ausência de IL-3 e NRG1. EV = vetor vazio; M = monômero & D = dímero.

[0045] Figuras 15A-C. Mutantes ERBB3 transformam e promovem sobrevivência independente de IL3 de células BaF3. Células BaF3 ex-

pressando estavelmente mutantes ERBB3 ou sozinhos (A) ou juntos com cada um de EGFR (B) ou ERBB2 (C) promove uma elevação na fosforilação de ERBB3 e seus efetores a jusante. Estudos BaF3 foram realizados na ausência de IL-3 e NRG1. EV = vetor vazio; M = monômero & D = dímero.

[0046] Figura 16. Uma imagem representativa de crescimento independente de ancoragem de células BaF3 expressando estavelmente mutantes ERBB3 ou sozinhos ou em combinação com cada um de EGFR ou ERBB2. Estudos BaF3 foram realizados na ausência de IL-3 e NRG1. EV = vetor vazio; M = monômero & D = dímero.

[0047] Figura 17. Anti-NRG1, um anticorpo de neutralização de NRG1 não afeta sobrevivência independente de IL-3- de células BaF3 promovidas por mutantes ERBB3 coexpressados com ERBB2. Estudos BaF3 foram realizados na ausência de IL-3 e NRG1. EV = vetor vazio; M = monômero & D = dímero.

[0048] Figura 18. Níveis elevados de mutante ERBB3 mutant/heterodímeros ERBB2 em células BaF3 na ausência de NRG1 como observado em material imunoprecipitado derivado em seguida a reticulação das proteínas de superfície celular usando BS3. Estudos BaF3 foram realizados na ausência de IL-3 e NRG1. EV = vetor vazio; M = monômero & D = dímero.

[0049] Figura 19. Níveis elevados de mutante ERBB3/heterodímeros ERBB2 em células BaF3 na ausência de NRG1 como observado na superfície de célula detectados usando um ensaio de ligação de proximidade 40. Estudos BaF3 foram realizados na ausência de IL-3 e NRG1. EV = vetor vazio; M = monômero & D = dímero.

[0050] Figura 20A-C. Quantificação de heterodímeros ERBB3-ERBB2. Imagens de Ensaio de ligação de proximidade (Figura 17) foram analisadas usando ferramenta de software de imagem Duolink

(Uppsala, Sweden). Pelo menos 100 células de 5 a 6 campos de imagem para a combinação indicada de células expressando ERBB3 e ERBB2 foram analisadas para sinal (pontos vermelhos) resultando de dímeros ERBB2/ERBB3. O ensaio foi realizado com anticorpo FLAG (ERBB3) e gD (ERBB2) (A) ou anticorpos ERBB3 e ERBB3 nativos (B). Os dados são mostrados como Média \pm SEM. Figura 20C mostra que NRG1 foi incapaz de suportar sobrevivência de células BaF3 expressando ERBB3-WT ou mutantes sozinhos.

[0051] Figura 21. Mutantes ERBB3 ECD mostram elevada sobrevivência de BaF3 independente de IL-3 em resposta a dose diferente de ligante exógeno NRG1. Estudos BaF3 foram realizados na ausência de IL-3. EV = vetor vazio; M = monômero & D = dímero.

[0052] Figura 22. Mutantes ERBB3 promovem oncogênese e levam a sobrevivência geral reduzida. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier para coortes de camundongos implantados com células BaF3 expressando a combinação indicada mutante ERBB3/ERBB2 mostram sobrevivência geral reduzida em comparação com célula de controle BaF3 (vetor) (n = 10 para braços; teste Log-rank $p < 0,0001$).

[0053] Figura 23. Análise citométrica de fluxo de células de medula óssea totais (A) e células de baço (B) isoladas de camundongos recebendo células BaF3 dirigidas para GFP expressando os vários mutantes ERBB3/ERBB2-WT.

[0054] Figura 24. Número médio de células positivas GFP na medula óssea (A) e baço (B) de camundongos (n = 3) dos braços de estudo indicados é mostrado.

[0055] Figura 25. Peso médio de baço (A) e fígado (B) dos camundongos (n=3) nos braços de estudo indicados é representado.

[0056] Figura 26. Seções representativas de medula óssea corada com H&E (superiores), baço (intermediárias) e fígado (inferiores) dos mesmos camundongos analisados na Figura 21. A medula óssea de

animais vetores vazios consiste em células hematopoiéticas normais. * = células de tumor infiltrantes, R = polpa vermelha, W = folículos linfoides de polpa branca. Em seção de baço não marcada, há uma perda de arquitetura de polpa vermelha/branca devido a rompimento por células de tumor infiltrantes. A barra de escala corresponde a 100µm.

[0057] Figura 27. Imagens representativas de baço e fígado de camundongos transplantados com mutante ERBB3 expressando células BaF3 são mostradas.

[0058] Figura 28. Eficácia de anticorpos anti-ERBB e inibidores de molécula pequena em atividade oncogênica de mutantes ERBB3. Efeito de terapêuticos dirigidos na proliferação independente de IL-3 de células BaF3 expressando estavelmente mutantes ERBB3 junto com ERBB2 como indicado na figura.

[0059] Figura 29. Imagens representativas do efeito de terapêuticos dirigidos no crescimento independente de ancoragem de células BaF3 expressando estavelmente mutantes ERBB3 junto com ERBB2 como indicado na figura.

[0060] Figura 30. Esquemático representando os receptores ERBB e vários agentes dirigidos que foram testados neste estudo.

[0061] Figura 31. Anticorpos anti-ERBB3 estão efetivamente dirigindo mutantes ERBB3 in vivo. Eficácia de 10mg/kg de anticorpos QW trastuzumab (Tmab), 50mg/kg QW anti-ERBB3.1 e 100mg/kg QW anti-ERBB3.2 no bloqueio de doença tipo leucemia induzida por células BaF3 expressando mutante ERBB3 G284R (A) ou Q809R (B) em combinação com ERBB2. Grupo tratado com anticorpo de controle (Control Ab) recebe 40 mg/kg de anticorpo QW anti-Ragweed.

[0062] Figura 32. Efeito de terapêuticos dirigidos em células BaF3 expressando estavelmente mutantes ERBB3 junto com ERBB2 como indicado na figura. Concentração de anticorpos e inibidores de molécula pequena usados para tratamento é a mesma que a indicada na Fi-

gura 27.

[0063] Figura 33. Efeito de anticorpos ERBB e inibidores de molécula pequena na fosforilação de ERBB3 e sinalização a jusante de moléculas em BaF3 a 8 h após tratamento é mostrado. Efeito destes mesmos agentes a 24 h é mostrado na Fig. 30.

[0064] Figura 34. Proporção de células BaF3 infiltrantes expressando mutante ERBB3, G284R (A) e Q809R (B) em medula óssea (BM) e baço em seguida ao tratamento com os anticorpos como indicado na figura.

[0065] Figura 35. Peso de fígado e baço de animal implantado com células mutantes ERBB3, G284R (A) e Q809R (B), em seguida a tratamento com os anticorpos como indicado.

[0066] Figura 36. Célula BaF3 GFP positiva infiltrante expressando mutante ERBB3 isolada de baço e medula óssea de camundongos implantados com estas células é mostrada.

[0067] Figura 37A-H. Mutantes ERBB3 transformam e promovem sobrevivência independente de IL3 de células BaF3. (A) Sobrevivência independente de IL3 de células BaF3 expressando estavelmente mutantes ERBB3 ou sozinhos ou junto com ERBB2 ou ERBB2-KD. (B) Uma imagem representativa de crescimento independente de ancoragem de células BaF3 expressando estavelmente mutantes ERBB3 ou sozinhos ou em combinação com cada um de ERBB2 ou ERBB2-KD. (C) Gráfico de barras mostrando o número de colônias formadas por células BaF3 expressando os mutantes ERBB3 junto com ERBB2 mostradas em (B). Muito poucas colônias foram formadas por células expressando mutantes ERBB3 sozinhos ou em combinação com ERBB2-KD. (D-F) Western blot mostrando estado de pERBB3, pERBB2, pAKT e pERK de células BaF3 expressando mutantes ERBB3 ou sozinhos (D) ou em combinação com ERBB2 (E) ou ERBB2-KD (F). (G) Anti-NRG1, um anticorpo de neutralização de N-

RG1 não afeta sobrevivência independente de IL-3- de células BaF3 promovidas por mutantes ERBB3 coexpressados com ERBB2. (H) Mutantes ERBB3 ECD mostram elevada sobrevivência de BaF3 independente de IL-3 em resposta a dose crescente de NRG1 exógeno. Estudos BaF3 foram realizados na ausência de IL-3 (A-H) e NRG1 (A-F). EV = vetor vazio; M = monômero & D = dímero.

[0068] Figuras 38A-J. Knockdowns de ERBB3 mediado por shRNA retarda crescimento de tumor. (A-J) CW-2 e DV-90 expressando estavelmente ERBB3 indutível dirigindo shRNA mediante indução dox mostrou níveis inferiores de ERBB3 e pERK (A, B), crescimento independente de ancoragem (C-F) e crescimento in vivo reduzido (H, J) em comparação com células não induzidas (A-F) ou células expressando shRNA dirigindo luciferase (A-F, G & I). Dados em (E, F) representam o número de colônias independentes de ancoragem formadas quantificadas de múltiplos campos de imagem como aquele mostrado em (C, D). Os dados são mostrados como Média \pm SEM.

[0069] Figura 39 fornece uma sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 2) para ErbB3. As mutações da presente invenção são indicadas pelos aminoácidos enquadados e códons enquadados/sublinhados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0070] A prática da presente invenção empregará, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular e bioquímica as quais estão dentro da habilidade na técnica. Essas técnicas são explicadas totalmente na literatura, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology", 4th edition (D.M. Weir & C.C.

Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); e "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994).

Definições

[0071] A menos que de outro modo definido, todos os termos da técnica, notações e outra terminologia científica utilizada aqui são destinados a ter os significados comumente entendidos por aqueles versados na técnica à qual esta invenção pertence. Em alguns casos, termos com significados comumente entendidos são definidos neste documento para clareza e/ou para pronta referência, e a inclusão dessas definições neste documento não deve necessariamente ser interpretada para representar uma diferença substancial sobre o que é geralmente entendido na técnica. As técnicas e os procedimentos descritos ou referenciados neste documento são geralmente bem entendidos e comumente empregados usando metodologia convencional por aqueles versados na técnica tal como, por exemplo, as metodologias de clonagem molecular amplamente utilizadas descritas em Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. Conform apropriado, os procedimentos envolvendo o uso de kits e reagentes comercialmente disponíveis é geralmente conduzido de acordo com os protocolos e/ou parâmetros definidos pelo fabricante, a menos que de outra forma observado. Antes de os presentes métodos, kits e usos para os mesmos serem descritos, é para ser entendido que esta invenção não é limitada à metodologia, aos protocolos, linhagens de células, espécies ou gêneros animais, constructos e reagentes particulares descritos e como tal, obviamente, podem variar. Deve também ser entendido que a terminologia usada neste documento é para finalidades de descrever modalidades particulares somente, e não pretende

limitar o escopo da presente invenção o qual será limitado somente pelas reivindicações anexadas.

[0072] Deve-se notar que, como usado neste documento e nas reivindicações anexadas, as formas singulares "um" "uma" e "o/a" incluem referentes plurais a menos que o contexto claramente determine de outra forma.

[0073] Ao longo deste relatório descritivo, a palavra "compreendem", ou variações como "compreende" ou "compreendendo" serão entendidas para implicar a inclusão de um número inteiro declarado ou grupos de números inteiros, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou grupo de números inteiros.

[0074] O termo "polinucleotídeo" ou "ácido nucleico", como usado intercambiavelmente neste documento, se refere a polímeros de nucleotídeos de qualquer tamanho e inclui DNA e RNA. Os nucleotídeos podem ser desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos, nucleotídeos modificados ou bases e/ou seus análogos ou qualquer substrato que pode ser incorporado em um polímero por polimerase de DNA ou RNA. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos modificados, tal como nucleotídeos metilados e seus análogos. Se presente, a modificação da estrutura de nucleotídeo pode ser transmitida antes ou após a montagem do polímero. A sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes não nucleotídeo. Um polinucleotídeo ainda pode ser modificado após polimerização, tal como por conjugação com um componente de marcação. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "capas", substituição de um ou mais dos nucleotídeos ocorrendo naturalmente por um análogo, modificações internucleotídeo, tal como, por exemplo, aquelas com ligações não carregadas (por exemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) e com ligações carregadas (por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquelas contendo frações pendentes, tal como,

por exemplo, proteínas (por exemplo, nucleases, toxinas, anticorpos, peptídeos sinal, poli-L-lisina, etc.), aquelas com intercaladores (por exemplo, acridina, psoralen, etc.), aquelas contendo quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, boro, metais oxidativos, etc.), aquelas contendo alquilantes, aquelas com ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), assim como formas não modificadas do(s) polinucleotídeo(s). Além disso, qualquer um dos grupos hidroxil ordinariamente presentes nos açúcares pode ser substituído, por exemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegido por grupos de proteção padrão ou ativado para preparar ligações adicionais aos nucleotídeos adicionais, ou pode ser conjugado a suportes sólidos. O OH 5' e 3' terminal pode ser fosforilado ou substituído por aminas ou frações de grupos de capeamento orgânicos de 1 a 20 átomos de carbono. Outras hidroxilas também podem ser derivatizadas para grupos de proteção padrão. Polinucleotídeos também podem conter formas análogas de açúcares ribose ou desoxirribose que são geralmente conhecidos na técnica incluindo, por exemplo, 2'-O-metil-2'-O-alil, 2'-fluor- ou 2'-azido-ribose, análogos de açúcar carbocíclico, açúcares .alfa.-anoméricos, açúcares epiméricos, tal como arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares de piranose, açúcares de furanose, sedoheptuloses, análogos acíclicos e análogos de nucleosídeo abásicos, tal como metil ribosida. Uma ou mais ligações fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativos. Estes grupos de ligação alternativos incluem, mas não são limitados a, modalidades em que fosfato é substituído por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH₂ ("formacetal"), nas quais cada R ou R' é independentemente H ou alquil substituído ou insubstituído (1-20 C) opcionalmente contendo uma ligação éter (--O--), arila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila ou araldila. Nem todas as ligações em um polinucleotídeo precisam ser idênticas. A descrição precedente

se aplica a todos os polinucleotídeos citados neste documento, incluindo RNA e DNA.

[0075] “Oligonucleotídeo”, como usado neste documento, se refere a polinucleotídeos curtos de fita simples que são de pelo menos cerca de sete nucleotídeos no comprimento e menos de 250 nucleotídeos no comprimento. Oligonucleotídeos podem ser sintéticos. Os termos "oligonucleotídeo" e "polinucleotídeo" são não mutuamente exclusivos. A descrição acima para polinucleotídeos é igualmente e completamente aplicável a oligonucleotídeos.

[0076] O termo “iniciador” se refere a um polinucleotídeo de fita simples que é capaz de hibridizar a um ácido nucleico e permitir a polimerização de um ácido nucleico complementar, geralmente fornecendo um grupo 3'--OH livre.

[0077] Como usado neste documento, o termo "gene" se refere a uma sequência de DNA que codifica através de seu gabarito ou RNA mensageiro uma sequência de aminoácidos característica de um peptídeo, polipeptídeo ou proteína específica. O termo "gene" também se refere a uma sequência de DNA que codifica um produto de RNA. O termo gene como usado neste documento com referência a DNA genômico inclui regiões intervenientes, não codificadoras, assim como regiões reguladoras e pode incluir extremidades 5' e 3'.

[0078] O termo “mutação somática” ou “variação somática” se refere a uma mudança em uma sequência de nucleotídeo (por exemplo, uma inserção, deleção, inversão ou substituição de um ou mais nucleotídeos) a qual é adquirida em uma célula do corpo em oposição a uma célula de linhagem germinal. O termo também engloba a mudança correspondente no complemento da sequência de nucleotídeo, a menos que de outro modo indicado.

[0079] O termo “variação de aminoácido” se refere a uma mudança em uma sequência e aminoácido (por exemplo, uma inserção,

substituição ou deleção de um ou mais aminoácidos, tal como uma deleção interna ou uma truncagem N- ou C-terminal) relativa a uma sequência de referência.

[0080] O termo “variação” se refere a cada uma de uma variação de nucleotídeo ou uma variação de aminoácido.

[0081] O termo “uma variação genética em uma posição de nucleotídeo correspondente a uma mutação somática”, “uma variação de nucleotídeo em uma posição e nucleotídeo correspondendo a uma mutação somática” e variações gramaticais do mesmo se referem a uma variação de nucleotídeo em uma sequência de polinucleotídeo na posição de DNA correspondente relativa ocupada pela dita mutação somática. O termo também engloba a variação correspondente no complemento da sequência de nucleotídeo, a menos que de outro modo indicado.

[0082] O termo “matriz” or “micromatriz” se refere a um arranjo ordenado de elementos de matriz hibridizáveis, preferivelmente sondas de polinucleotídeo (por exemplo, oligonucleotídeos) em um substrato. O substrato pode ser um substrato sólido, tal como uma lâmina de vidro, ou um substrato semissólido, tal como membrana de nitrocelulose.

[0083] O termo "amplificação" se refere ao processo para produzir uma ou mais cópias de uma sequência de ácido nucleico de referência ou seu complemento. Amplificação pode ser linear ou exponencial (por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR)). Uma "cópia" não significa necessariamente complementariedade ou identidade de sequência perfeita em relação à sequência modelo. Por exemplo, as cópias podem incluir análogos de nucleotídeo, tal como desoxinosina, alterações de sequência intencionais (tal como alterações de sequência introduzidas por meio de um iniciador compreendendo uma sequência que é hibridizável, mas não completamente complementar ao modelo) e/ou erros de sequência que ocorrem durante amplificação.

[0084] O termo "oligonucleotídeo específico de mutação" se refere a um oligonucleotídeo que hibridiza para uma região de um ácido nucleico alvo que compreende uma variação de nucleotídeo (frequentemente uma substituição). "Hibridização específica de mutação somática" significa que quando um oligonucleotídeo específico de mutação é hibridizado para seu ácido nucleico alvo, um nucleotídeo no oligonucleotídeo específico de mutação especificamente emparelha em base com a variação de nucleotídeo. Um oligonucleotídeo específico de mutação somática capaz de hibridização específica de mutação com respeito a uma variação de nucleotídeo particular é dito ser "específico para" essa variação.

[0085] O termo "iniciador específico de mutação" se refere a um oligonucleotídeo específico de mutação que é um iniciador.

[0086] O termo "ensaio de extensão de iniciador" se refere a um ensaio no qual nucleotídeos são adicionados a um ácido nucleico resultando em um ácido nucleico mais longo ou "produto de extensão" que é detectado diretamente ou indiretamente. Os nucleotídeos podem ser adicionados para estender a extremidade 5' ou 3' do ácido nucleico.

[0087] O termo "ensaio de incorporação de nucleotídeo específico de mutação" se refere a um ensaio de extensão de iniciador no qual um iniciador é (a) hibridizado a ácido nucleico alvo em uma região que é 3' ou 5' de uma variação de nucleotídeo e (b) estendido por uma polimerase, desse modo incorporando no produto de extensão um nucleotídeo que é complementar à variação de nucleotídeo.

[0088] O termo "ensaio de extensão de iniciador específico de mutação" se refere a um ensaio de extensão de iniciador no qual um iniciador específico de mutação é hibridizado a um ácido nucleico alvo e estendido.

[0089] O termo "ensaio de hibridização de oligonucleotídeo especí-

fico de mutação" se refere a um ensaio no qual (a) um oligonucleotídeo específico de mutação é hibridizado a um ácido nucleico alvo e (b) a hidridização é detectada diretamente ou indiretamente.

[0090] O termo "ensaio de nuclease 5'" se refere a um ensaio no qual a hibridização de um oligonucleotídeo específico de mutação a um ácido nucleico alvo permite clivagem nucleolítica da sonda hibridizada, resultando em um sinal detectável.

[0091] O termo "ensaio empregando molecular beacons" se refere a um ensaio no qual a hibridização de um oligonucleotídeo específico de mutação a um ácido nucleico alvo resulta em um nível sinal detectável que é mais alto do que o nível de sinal detectável emitido pelo oligonucleotídeo livre.

[0092] O termo "ensaio de ligação de oligonucleotídeo" se refere a um ensaio no qual um oligonucleotídeo específico de mutação e um segundo oligonucleotídeo são hibridizados adjacentes um ao outro em um ácido nucleico alvo e ligados juntos (seja diretamente ou indiretamente por meio de nucleotídeos intervenientes) e o produto de ligação é detectado diretamente ou indiretamente.

[0093] O termo "sequência-alvo", "ácido nucleico alvo" ou "sequência de ácido nucleico alvo" se refere geralmente a uma sequência de polinucleotídeo de interesse na qual uma variação de nucleotídeo é suspeita ou conhecida por residir, incluindo cópias desse ácido nucleico alvo geradas por amplificação.

[0094] O termo "detecção" inclui qualquer meio de detecção incluindo detecção direta e indireta.

[0095] Os termos "câncer" e "canceroso" se referem ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento de células desregulado. O câncer diagnosticado de acordo com a presente invenção é qualquer tipo de câncer caracterizado pela presença de uma mutação ErbB3, especificamente incluindo

câncer metastático ou não ressecável localmente avançado, incluindo, sem limitação, gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, colorretal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma escamoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), câncer de pulmão, câncer de cabeça e pescoço e pancreático.

[0096] Com usado neste documento, um indivíduo "em risco" de desenvolver câncer pode ou pode não ter doença ou sintomas de doença detectáveis e pode ou pode não ter exibido doença ou sintomas de doença detectáveis antes dos métodos de diagnóstico descritos neste documento. "Em risco" denota que um indivíduo tem um ou mais fatores de risco os quais são parâmetros mensuráveis que se correlacionam com o desenvolvimento de câncer, como descrito neste documento e conhecido na técnica. Um indivíduo tendo um ou mais destes fatores de risco tem uma probabilidade mais alta de desenvolver câncer do que um indivíduo sem um ou mais destes fatores de risco.

[0097] O termo "diagnóstico" é usado neste documento para se referir à identificação ou classificação de um estado molecular ou patológico, doença ou condição, por exemplo, câncer. "Diagnóstico" também pode se referir à classificação de um subtipo particular de câncer, por exemplo, por características moleculares (por exemplo, uma subpopulação de pacientes caracterizada por variação(ões) de nucleotídeo em um gene ou região de ácido nucleico particular).

[0098] O termo "auxiliar diagnóstico" é usado neste documento para se referir a métodos que auxiliam a fazer uma determinação clínica a respeito da presença, ou natureza, de um tipo particular de sintoma ou condição de câncer. Por exemplo, um método de auxiliar diagnóstico de câncer pode compreender medir a presença ou ausência de um ou mais marcadores genéticos indicativos de câncer ou um risco

elevado de ter câncer em uma amostra biológica de um indivíduo.

[0099] O termo "prognóstico" é usado neste documento para se referir à predição da probabilidade de desenvolver câncer. O termo "predição" é usado neste documento para se referir à probabilidade de que um paciente responderá ou favoravelmente ou desfavoravelmente a uma droga ou conjunto de fármacos. Em uma modalidade, a predição se refere à extensão dessas respostas. Em uma modalidade, a predição se refere a se e/ou a probabilidade que um paciente sobreviverá ou melhorará em seguida ao tratamento, por exemplo, tratamento com um agente terapêutico particular e, por um certo período de tempo, sem recorrência da doença. Os métodos preditivos da invenção podem ser usados clinicamente para tomar decisões de tratamento escolhendo as modalidades de tratamento mais apropriadas para qualquer paciente particular. Os métodos preditivos da presente invenção são ferramentas valiosas na predição se um paciente está inclinado a responder favoravelmente a um regime de tratamento, tal como um dado regime terapêutico, incluindo, por exemplo, administração de um dado agente ou combinação terapêutica, intervenção cirúrgica, tratamento com esteroide, etc., ou se a sobrevivência a longo prazo do paciente, em seguida a um regime terapêutico, é provável.

[00100] Como usado neste documento, "tratamento" se refere a intervenção clínica em uma tentativa de alterar o curso natural do indivíduo ou célula sendo tratada, e pode ser executado antes ou durante o curso da patologia clínica. Efeitos desejáveis de tratamento incluem prevenir a ocorrência ou recorrência de uma doença ou uma condição ou sintoma da mesma, aliviar uma condição ou sintoma da doença, diminuir quaisquer consequências patológicas diretas ou indiretas da doença, diminuir a taxa de progressão da doença, melhorar ou paliar o estado da doença e atingir remissão ou prognóstico melhorado. Em algumas modalidades, métodos e composições da invenção são úteis

em tentativas para retardar o desenvolvimento de uma doença ou distúrbio.

[00101] Um "agente terapêutico de câncer", um "efeito de agente terapêutico para tratar câncer", e variações gramaticais dos mesmos, como usados neste documento, se referem a um agente que quando fornecido em uma quantidade eficaz é conhecido, clinicamente demonstrado ou esperado por clínicos como fornecendo um benefício terapêutico em um indivíduo que tem câncer. Em uma modalidade, a frase inclui qualquer agente que é comercializado por um fabricante, ou de outro modo usado por clínicos licenciados, como um agente clinicamente aceito que quando fornecido em uma quantidade eficaz seria esperado de fornecer um efeito terapêutico em um indivíduo que tem câncer. Em várias modalidades não limitantes, um agente terapêutico de câncer compreende agentes de quimioterapia, inibidores de dimerização HER, anticorpos HER, anticorpos dirigidos contra antígenos associados a tumor, compostos anti-hormonais, citocinas, fármacos dirigidas a EGFR, agentes antiangiogênicos, inibidores de tirosina cinases, agentes e anticorpos inibidores de crescimento, agentes citotóxicos, anticorpos que induzem apoptose, inibidores COX, inibidores de farnesil transferase, anticorpos que ligam proteína oncofetal CA 125, vacinas HER2, inibidores Raf ou ras, doxorubicina lipossomal, topotecano, taxeno, inibidores de tirosina cinase duais, TLK286, EMD-7200, pertuzumabe, trastuzumabe, erlotinibe e bevacizumabe.

[00102] Uma "quimioterapia" é o uso de um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos, usados em quimioterapia, incluem agentes de alquilação, tal como tio-tepa e CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquil sulfonatos, tal como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas, tal como benzodopa, carboquone, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamine, trietilenofosforamida, trietilenotiofos-

foramida e trimetilolomelamina; TLK 286 (TELCYTA™); acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo análogo sintético topotecano (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina e 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; nitrogênio mostardas, tal como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uracil mostarda; nitrosureias, tal como, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; bisfosfonatos, tal como clodronato; antibióticos, tal como os antibióticos enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamm1l e caliqueamicina ômega1 (ver, *por exemplo*,., Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)) e antraciclinas, tal como anamicina, AD 32, alcarrubicina, daunorrubicina, dexrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarrubicina, KRN5500, menogaril, dinemicina, incluindo dinemicina A, uma esperamicina, cromóforo neocarzinostatina e cromóforos de antibiótico enedina de cromoproteína relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorrubicina (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorrubicina lipossomal e desoxidoxorrubicina), esorubicina, marcelomicina, mitomicinas, tal como mitomicina C, ácido mi-

cofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, e zorrubicina; análogos de ácido fólico, tal como denopterina, pteropterina e trimetrexato; análogos de purina, tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina e tioguanina; análogos de pirimidina, tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina e floxuridina; andrógenos, tal como calusterona, proprionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestana e testolactona; antiadrenais, tal como, aminoglutetimida, mitotano e trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido folínico (leucovorina); aceglatona; agentes antifolato e antineoplásicos, tal como ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inibidores de di-hidrofolato redutase, tal como methotrexate, antimetabólitos, tal como 5-fluoruracil (5-FU) e suas pro-fármacos, tal como UFT, S-1 e capecitabina e inibidores de timidilato sintase e inibidores de glicinamida ribonucleotídeo formiltransferase, tal como raltitrexed (TOMUDEx^{RM}, TDX); inibidores de di-hidropirimidina de-hidrogenase, tal como eniluracil; aldofosfamida glicosida; ácido aminolevulínico; ansacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxate; defofamina; demecolcina; diazi-quona; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxiiureia; lentinan; lonidainina; maitansinoides, tal como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK7 complexo de polissacarídeo (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxane; rizoxina; sizofiran; espiro-germânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides e taxenos, e.g., TA-

XOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ formulação de nanopartícula engenheirada com albumina livre de cromóforo de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), e TAXOTERE® docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); cloranbucil; gencitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; platina; análogos de platina ou análogos à base de platina, tal como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vinblastina (VELBAN®); etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); vinca alcaloide; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexate; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluormetilornitina (DMFO); retinoides, tal como ácido retinoico; sais farmaceuticamente aceitáveis, ácido ou derivados de qualquer um dos acima; assim como combinações de dois ou mais dos acima, tal como CHOP, uma abreviação para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona e FOLFOX, uma abreviação para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATIN™) combinada com 5-FU e leucovorina.

[00103] O termo "formulação farmacêutica" se refere a uma preparação a qual está em tal forma a permitir que a atividade biológica de um ingrediente ativo contido na mesma seja eficaz e a qual não contém componentes adicionais os quais são inaceitavelmente tóxicos a um indivíduo ao qual a formulação será administrada.

[00104] Um "transportador farmaceuticamente aceitável" se refere a um ingrediente em uma formulação farmacêutica, que não um ingrediente ativo, o qual não é tóxico a um indivíduo. Um transportador farmaceuticamente aceitável inclui, mas não se limita a, um tampão, excipiente, estabilizador ou preservativo.

[00105] Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários,

para atingir o resultado terapêutico ou profilático desejado. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um agente terapêutico pode variar de acordo com fatores tais como o estado de doença, idade, sexo e peso do indivíduo e a capacidade de o anticorpo elicitar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é uma na qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do agente terapêutico são compensados pelos efeitos benéficos terapeuticamente. No caso de câncer, a quantidade terapeuticamente eficaz da droga pode reduzir o número de células de câncer; reduzir o tamanho do tumor; inibir (isto é, retardar até certo grau e, de preferência, parar) infiltração de células de câncer em órgãos periféricos; inibir (isto é, retardar até certo grau e, de preferência, parar) metástase de tumor; inibir, até certo grau, crescimento de tumor; e/ou aliviar até certo grau um ou mais dos sintomas associados com o câncer. Até o grau que a droga pode impedir crescimento e/ou matança de células cancerígenas existentes, ela pode ser citostática e/ou citotóxica. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado profilático desejado. Tipicamente, mas não necessariamente, uma vez que uma dose profilática seja usada antes da ou em um estágio anterior da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor que a quantidade terapeuticamente eficaz.

[00106] Um "indivíduo", "indivíduo" ou "paciente" é um vertebrado. Em certas modalidades, o vertebrado é um mamífero. Mamíferos incluem, mas não são limitados a, primatas (incluindo primatas humanos e não humanos) e roedores (por exemplo, camundongos e ratos). Em certas modalidades, um mamífero é um humano.

[00107] Uma "subpopulação de paciente" e variações gramaticais da mesma, como usada neste documento, se refere a um subconjunto de pacientes caracterizado como tendo uma ou mais características

mensuráveis e/ou identificáveis distintivas que distinguem o subconjunto de pacientes de outros na categoria de doença mais ampla à qual ele pertence. Essas características incluem subcategorias de doença, gênero, estilo de vida, histórico de saúde, órgãos/tecidos envolvidos, histórico de tratamento, etc. Em uma modalidade, uma subpopulação de paciente é caracterizada por assinaturas de ácido nucleico incluindo variações de nucleotídeo, em particular posições e/ou regiões de nucleotídeo (tal como mutações somáticas).

[00108] Um "indivíduo de controle" se refere a um indivíduo saudável que não foi diagnosticado como tendo câncer e que não sofre de qualquer sinal ou sintoma associado com câncer.

[00109] O termo "amostra", como usado neste documento, se refere a uma composição que é obtida ou derivada de um indivíduo de interesse que contém uma entidade molecular celular e/ou outra que será caracterizada e/ou identificada, por exemplo, com base em características físicas, bioquímicas, químicas e/ou fisiológicas. Por exemplo, a frase "amostra de doença" e variações da mesma se refere a qualquer amostra obtida de um indivíduo de interesse que seria esperado ou é conhecido por conter a entidade celular e/ou molecular que será caracterizada.

[00110] Por "amostra de tecido ou célula" queremos dizer uma coleção de células similares obtidas de um tecido de um indivíduo ou paciente. A fonte da amostra de tecido ou célula pode ser tecido sólido como de uma amostra ou biópsia ou aspirado de órgão ou tecido fresco, congelado e/ou preservado; sangue ou quaisquer constituintes de sangue; fluidos corporais, tal como soro, urina, esputo ou saliva. A amostra de tecido também pode ser de células ou linhagens de células primárias ou cultivadas. Opcionalmente, a amostra de tecido ou célula é obtida de um tecido/órgão de doença. A amostra de tecido pode conter compostos os quais não são naturalmente intermisturados com o

tecido na natureza, tal como conservantes, anticoagulantes, tampões, fixadores, nutrientes, antibióticos ou similares. Uma "amostra de referência", "célula de referência", "tecido de referência", "amostra de controle", "célula de controle" ou "tecido de controle", como usado neste documento, se refere a uma amostra, célula ou tecido obtido de uma fonte conhecida, ou acreditada, não ser afligida com a doença ou condição para a qual um método ou uma composição da invenção está sendo usada para identificar. Em uma modalidade, uma amostra de referência, célula de referência, tecido de referência, amostra de controle, célula de controle ou tecido de controle é obtido de uma parte saudável do corpo do mesmo indivíduo ou paciente em quem uma doença ou condição está sendo identificada usando uma composição ou método da invenção. Em uma modalidade, uma amostra de referência, célula de referência, tecido de referência, amostra de controle, célula de controle ou tecido de controle é obtido de uma parte saudável do corpo de um indivíduo que não é o indivíduo ou paciente em quem uma doença ou condição está sendo identificada usando uma composição ou método da invenção.

[00111] Para os propósitos deste documento, uma "seção" de uma amostra de tecido significa uma única parte ou pedaço de uma amostra de tecido, por exemplo, uma fatia fina de corte de tecido ou células de uma amostra de tecido. Entende-se que múltiplas seções de amostras de tecido podem ser tomadas e submetidas a análise de acordo com a presente invenção, contanto que seja entendido que a presente invenção compreende um método pelo qual a mesma seção de amostra de tecido é analisada em ambos os níveis morfológico e molecular ou é analisada com respeito a ambas proteína e ácido nucleico.

[00112] Por "correlacionar" ou "correlacionando" queremos dizer comparar, de qualquer maneira, o desempenho e/ou resultados de uma primeira análise ou protocolo com o desempenho e/ou resultados

de uma segunda análise ou protocolo. Por exemplo, podemos usar os resultados de uma primeira análise ou protocolo na execução de um segundo protocolo e/ou podemos usar os resultados de uma primeira análise ou protocolo para determinar se uma segunda análise ou protocolo deve ser executado. Com respeito à modalidade de análise ou protocolo de expressão de gene podemos usar os resultados da análise ou protocolo de expressão de gene para determinar se um regime terapêutico específico deve ser executado.

[00113] Uma "molécula pequena" ou "molécula orgânica pequena" é definida neste documento como uma molécula orgânica tendo um peso molecular abaixo de cerca de 500 Dáltons.

[00114] A palavra "marcação" quando usada neste documento se refere a um composto ou uma composição detectável. A marcação pode ser detectável por si só (por exemplo, marcadores de radioisótopo ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou uma composição de substrato, o que resulta em um produto detectável. Radionuclídeos que podem servir como marcadores detectáveis incluem, por exemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 e Pd-109.

[00115] Referência a "cerca de" um valor ou parâmetro neste documento inclui (e descreve) modalidades que são dirigidas a esse valor ou parâmetro por si. Por exemplo, a descrição referente a "cerca de X" inclui a descrição de "X".

[00116] O termo "inserção de embalagem" é usado para se referir a instruções costumeiramente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos que contêm informação sobre as indicações, o uso, a dosagem, a administração, terapia de combinação, contraindicações e/ou avisos envolvendo o uso desses produtos terapêuticos.

[00117] Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são usados inter-

cambiavelmente no sentido mais amplo e incluem anticorpos monoclonais (por exemplo, anticorpos monoclonais de comprimento total ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos monovalentes, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos bi-específicos contanto que eles exibam a atividade biológica desejada) e também podem incluir certos fragmentos de anticorpo (como descrito em mais detalhes neste documento). Um anticorpo pode ser quimérico, humano, humanizado e/ou maduro por afinidade. "Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente compreendendo a região de ligação ao antígeno do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')₂, e fragmentos Fv; diabodies; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia simples; e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo.

[00118] Um anticorpo desta invenção "o qual liga" um antígeno de interesse é um que liga o antígeno com afinidade suficiente, de modo que o anticorpo seja útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico no direcionamento a uma proteína ou uma célula ou tecido expressando o antígeno. Com respeito à ligação de um anticorpo a uma molécula alvo, o termo "ligação específica" ou "especificamente liga a" ou é "específico para" um polipeptídeo particular ou um epítipo em um alvo de polipeptídeo particular significa ligação que é mensuravelmente diferente de uma interação não específica. Ligação específica pode ser medida, por exemplo, determinando a ligação de uma molécula em comparação com a ligação de uma molécula de controle. Por exemplo, ligação específica pode ser determinada por competição com uma molécula de controle que é similar ao alvo, por exemplo, um excesso de alvo não marcado. Neste caso, a ligação específica é indicada se a ligação do alvo marcado a uma sonda é competitivamente inibida por excesso de alvo não marcado. Em uma modalidade particular, "especi-

ficamente liga" se refere a ligação de um anticorpo a seus receptores HER alvo especificados e não outros receptores HER não alvo especificados. Por exemplo, um anticorpo anti-HER3 especificamente liga a HER3, mas não liga especificamente a EGFR, HER2 ou HER4. Um anticorpo biespecífico EGFR/HER3 especificamente liga a EGFR e HER3, mas não liga especificamente a HER2 ou HER4.

[00119] Um "receptor HER" ou "receptor ErbB" é uma tirosina cinase de proteína de receptor a qual pertence à família de receptor HER e inclui receptores EGFR (ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4). O receptor HER geralmente compreenderá um domínio extracelular o qual pode ligar a um ligante HER e/ou dimerizar com outra molécula de receptor HER; um domínio transmembrana lipofílico; um domínio de tirosina cinase intracelular conservado; e um domínio de sinalização carboxil-terminal alojando vários resíduos de tirosina os quais podem ser fosforilados. O receptor HER pode ser um receptor HER de "sequência nativa" ou uma "variante de sequência de aminoácido" do mesmo. Preferivelmente, o receptor HER é um receptor HER humano de sequência nativa. A "via HER" se refere à rede de sinalização mediada pela família de receptor HER.

[00120] Os termos "ErbB1", "HER1", "receptor de fator de crescimento epidérmico" e "EGFR" são usados intercambiavelmente neste documento e se referem a EGFR como divulgado, por exemplo, em Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), incluindo formas mutantates ocorrendo naturalmente do mesmo (por exemplo, um EGFR mutante de deleção como em Ullrich et al., Nature (1984) 309:418-425 e Humphrey et al. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)), assim como variantes do mesmo, tal como EGFRvIII. Variantes de EGFR também incluem variantes de deleção, substituição e inserção, por exemplo, aquelas descritas em Lynch et al. (New England Journal of Medicine 2004, 350:2129), Paez et al. (Science 2004, 304:1497) e Pao

et al. (PNAS 2004, 101 :13306). Neste documento, "domínio extracelular EGFR" ou "EGFR ECD" se refere a um domínio de EGFR que está fora de uma célula, ou ancorado a uma membrana de célula, ou em circulação, incluindo fragmentos do mesmo. Em uma modalidade, o domínio extracelular de EGFR pode compreender quatro domínios: "Domínio I" (resíduos de aminoácido de cerca de 1-158, "Domínio II" (resíduos de aminoácido 159-336), "Domínio III" (resíduos de aminoácido 337-470) e "Domínio IV" (resíduos de aminoácido 471-645), onde os limites são aproximados e podem variar em cerca de 1-3 aminoácidos.

[00121] As expressões "ErbB2" e "HER2" são usadas intercambiavelmente neste documento e se referem a proteína HER2 humana descrita, por exemplo, em Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) e Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (número de acesso GenBank X03363). O termo "erbB2" se refere ao gene codificando HER2 e "neu" se refere ao gene codificando p185^{neu} de rato. HER2 preferido é HER2 humano de sequência nativa.

[00122] Neste documento, "domínio extracelular HER2" ou "HER2 ECD" se refere a um domínio de HER2 que está fora de uma célula, ou ancorado a uma membrana de célula, ou em circulação, incluindo fragmentos do mesmo. Em uma modalidade, o domínio extracelular de HER2 pode compreender quatro domínios: "Domínio I" (resíduos de aminoácido de cerca de 1-195, "Domínio II" (resíduos de aminoácido de cerca de 196-319), "Domínio III" (resíduos de aminoácido de cerca de 320-488) e "Domínio IV" (resíduos de aminoácido 489-630) (numeração de resíduo sem peptídeo sinal). See Garrett et al. Mol. Cell. 11 : 495-505 (2003), Cho et al. Nature 418 : 756-760 (2003), Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004), e Plowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1746-1750 (1993).

[00123] "ErbB3" e "HER3" se referem ao polipeptídeo receptor co-

mo divulgado, por exemplo, nas Patentes US 5.183.884 e 5.480.968, assim como Kraus et al. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989) (ver também Figuras 2 e 3).

[00124] Neste documento, "domínio extracelular HER3" ou "HER3 ECD" ou "domínio extracelular ErbB3" se refere a um domínio de HER3 que está fora de uma célula, ou ancorado a uma membrana de célula, ou em circulação, incluindo fragmentos do mesmo. Em uma modalidade, o domínio extracelular de HER3 pode compreender quatro domínios: Domínio I, Domínio II, Domínio III e Domínio IV. Em uma modalidade, o HER3 ECD compreende aminoácidos 1-636 (numeração incluindo peptídeo sinal). Em uma modalidade, o domínio III de HER3 compreende aminoácidos 328-532 (numeração incluindo peptídeo sinal).

[00125] Os termos "ErbB4" e "HER4" neste documento se referem ao polipeptídeo receptor como divulgado, por exemplo, no Pedido de Patente EP 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); e Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993), incluindo isoformas do mesmo, por exemplo, como divulgado em WO99/19488, publicado em 22 de abril de 1999. Por "ligante HER" queremos dizer um polipeptídeo que liga a e/ou ativa um receptor HER. O ligante HER de interesse particular neste documento é um ligante HER humano de sequência nativa, tal como fator de crescimento epidérmico (EGF) (Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)); fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) (Marquardt et al., Science 223:1079-1082 (1984)); amphiregulin also known as schwannoma or keratinocyte autocrine growth factor (Shoyab et al. Science 243:1074-1076 (1989); Kimura et al. Nature 348:257-260 (1990); e Cook et al. Mol Cell Biol. 11 :2547-2557 (1991)); betacellulin (Shing et al., Science 259:1604-1607 (1993); e Sasada et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)); fator de crescimento epidérmico de ligação a heparina (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science 251 :936-

939 (1991)); epirregulina (Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); e Komurasaki et al. Oncogene 15:2841-2848 (1997)); uma herregulina (ver abaixo); neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)); neurregulina-4 (NRG-4) (Harari et al. Oncogene 18:2681-89 (1999)); e cripto (CR-I) (Kanmm et al. J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335 (1997)). Ligantes HER os quais ligam EGFR incluem EGF, TGF- α , amfirregulina, betacelulina, HB-EGF e epirregulina. Ligantes HER os quais ligam HER3 incluem herregulinas e NRG-2. Ligantes HER capazes de ligar HER4 incluem betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4, e herregulinas.

[00126] "Herregulina" (HRG) quando usada neste documento se refere a um polipeptídeo codificado pelo produto de gene de herregulina com divulgado na Patente US 5.641.869, ou Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993). Exemplos de herregulinas incluem herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 e herregulina- β 3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); e Patente US 5.641.869); fator de diferenciação neu (NDF) (Peles et al. Cell 69: 205-216 (1992)); atividade indutora de receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls et al. Cell 72:801-815 (1993)); fatores de crescimento gliais (GGFs) (Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)); fator derivado de neurônio sensorial e motor (SMDF) (Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); γ -herregulina (Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)). Um "dímero HER" neste documento é um dímero associado não covalentemente compreendendo pelo menos dois receptores HER. Esses complexos podem se formar quando uma célula expressando dois ou mais receptores HER é exposta a um ligante de HER e podem ser isolados por imunoprecipitação e analisados por SDS-PAGE como descrito em Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994), por exemplo. Outras proteínas, tal como subunidade de receptor de citocina

(por exemplo, gpl30), podem ser associadas com o dímero.

[00127] Um "heterodímero HER" neste documento é um heterodímero associado não covalentemente compreendendo pelo menos dois receptores HER diferentes, tal como heterodímeros EGFR-HER2, EGFR-HER3, EGFR-HER4, HER2-HER3 ou HER2-HER4.

[00128] Um "inibidor HER" ou "inibidor ErbB" ou "antagonista ErbB" é um agente o qual interfere com ativação ou função de HER. Exemplos de inibidores HER incluem anticorpos HER (por exemplo, anticorpos EGFR, HER2, HER3 ou HER4); fármacos dirigidas a EGFR; antagonistas HER de molécula pequena; inibidores de tirosina cinase HER; inibidores de tirosina cinase duplos HER2 e EGFR, tal como lapatinib/GW572016; moléculas antissenso (ver, por exemplo, WO2004/87207); e/ou agentes que ligam a, ou interferem com a função de, moléculas de sinalização a jusante, tal como MAPK ou Akt. Preferivelmente, o inibidor HER é um anticorpo o qual liga a um receptor HER. Em geral, um inibidor HER se refere àqueles compostos que especificamente ligam a um receptor HER particular e evitam ou reduzem sua atividade de sinalização, mas não ligam especificamente a outros receptores HER. Por exemplo, um antagonista HER3 especificamente liga para reduzir sua atividade, mas não liga especificamente a EGFR, HER2, ou HER4.

[00129] Um "inibidor de dimerização HER" ou "HDI" é um agente o qual inibe a formação de um homodímero HER ou heterodímero HER. Preferivelmente, o inibidor de dimerização HER é um anticorpo. No entanto, inibidores de dimerização HER também incluem moléculas pequenas de peptídeo e não peptídeo e outras entidades químicas as quais inibem a formação de homo ou heterodímeros HER.

[00130] Um anticorpo o qual "inibe dimerização HER" é um anticorpo o qual inibe, ou interfere com, a formação de um dímero HER, independentemente do mecanismo subjacente. Em uma modalidade,

esse anticorpo liga a HER2 no sítio de ligação heterodimérico do mesmo. Um exemplo particular de um anticorpo de inibição de dimerização é pertuzumab (Pmab), ou MAb 2C4. Outros exemplos de inibidores de dimerização HER incluem anticorpos os quais ligam a EGFR e inibem dimerização do mesmo com um ou mais outros receptores HER (por exemplo, anticorpo monoclonal 806 EGFR, MAb 806, o qual liga a EGFR ativado ou "desamarrado" EGFR; ver Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); anticorpos os quais ligam a HER3 e inibem dimerização do mesmo com um ou mais outros receptores HER; anticorpos os quais ligam a HER4 e inibem dimerização do mesmo com um ou mais outros receptores HER; inibidores de dimerização de peptídeo (Patente US 6.417.168); inibidores de dimerização antissenso; etc.

[00131] Como usado neste documento, "antagonista HER2" ou "inibidor EGFR" se referem àqueles compostos que especificamente ligam a EGFR e previnem ou reduzem sua atividade de sinalização e não ligam especificamente a HER2, HER3, ou HER4. Exemplos desses agentes incluem anticorpos e moléculas pequenas que ligam a EGFR. Exemplos de anticorpos os quais ligam a EGFR incluem

[00132] Como usado neste documento, "antagonista EGFR" ou "inibidor EGFR" se referem àqueles compostos que especificamente ligam a EGFR e previnem ou reduzem sua atividade de sinalização e não ligam especificamente a HER2, HER3, ou HER4. Exemplos desses agentes incluem anticorpos e moléculas pequenas que ligam a EGFR. Exemplos de anticorpos os quais ligam a EGFR incluem MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (ver, Patente US 4.943.533, Mendelsohn et al.) e variantes dos mesmos, tal como 225 quimerizado (C225 ou Cetuximab; ERBITUX®) e 225 humano remodelado (H225) (ver, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, um

anticorpo dirigido a EGFR totalmente humano (Imclone); anticorpos que ligam EGFR mutante tipo II (Patente US 5.212.290); anticorpos humanizados e quiméricos que ligam EGFR como descrito na Patente US 5.891.996; e anticorpos humanos que ligam EGFR, tal como ABX-EGF ou Panitumumab (ver WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) um anticorpo EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compete com ambos EGF e TGF-alfa para ligação a EGFR (EMD/Merck); anticorpo EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticorpos totalmente humanos como E1 .1 , E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6. 3 e E7.6. 3 e descritos em US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); e mAb 806 ou mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). O anticorpo anti-EGFR pode ser conjugado com um agente citotóxico, assim gerando um imunoconjugado (ver, por exemplo, EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Antagonistas EGFR incluem moléculas pequenas, tal como compostos descritos nas Patentes US: 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008, e 5.747.498, assim como as seguintes publicações PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016 e WO99/24037. Antagonistas EGFR de molécula pequena particulares incluem OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorfenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, dicloridrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-Cloro-4'-fluoranilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluor-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pyrimido[5,4-d]pirimidina-2,8-

diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(l-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(l-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butinamida; EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorfenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Sugen); e AG1571 (SU 5271; Sugen).

[00133] Um "anticorpo HER" é um anticorpo que liga a um receptor HER. Opcionalmente, o anticorpo HER ainda interfere com ativação ou função de HER. Anticorpos HER2 particulares incluem pertuzumab e trastuzumab. Exemplos de anticorpos EGFR particulares incluem cetuximab e panitumumab. Publicações de patente relativas a anticorpos HER incluem: US 5.677.171, US 5.720.937, US 5.720.954, US 5.725.856, US 5.770.195, US 5.772.997, US 6.165.464, US 6.387.371, US 6.399.063, US2002/019221 A1, US 6.015.567, US 6.333.169, US 4.968.603, US 5.821.337, US 6.054.297, US 6.407.213, US 6.719.971, US 6.800.738, US2004/0236078A1, US 5.648.237, US 6.267.958, US 6.685.940, US 6.821.515, WO98/17797, US 6.333.398, US 6.797.814, US 6.339.142, US 6.417.335, US 6.489.447, WO99/31140, US2003/0147884A1, US2003/0170234A1, US2005/0002928A1, US 6.573.043, US2003/0152987A1, WO99/48527, US2002/0141993A1, WO01/00245, US2003/0086924, US2004/0013667A1, WO00/69460, WO01/00238, WO01/15730, US 6.627.196 B1, US 6.632.979 B1, WO01/00244, US2002/0090662A1, WO01/89566, US2002/0064785, US2003/0134344, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, US 5.985.553, US 5.747.261, US 4.935.341, US 5.401.638, US 5.604.107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412,116 B1, EP 494,135B1, US 5.824.311, EP 444,181B1, EP 1,006,194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, US 5.571.894, US

5.939.531, EP 502.812 B1, WO 93/03741, EP 554,441 B1, EP 656.367 A1, US 5.288.477, US 5.514.554, US 5.587.458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5.877.305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5.856.089, WO 94/22478, US 5.910.486, US 6.028.059, WO 96/07321, US 5.804.396, US 5.846.749, EP 711.565, WO 96/16673, US 5.783.404, US 5.977.322, US 6.512.097, WO 97/00271, US 6.270.765, US 6.395.272, US 5.837.243, WO 96/40789, US 5.783.186, US 6.458.356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6.214.388, US 5.925.519, WO 98/02463, US 5.922.845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5.994.071, WO 98/45479, US 6.358.682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, US 6.582.919, US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6.602.670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1.357.132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5.705.157, US 6.123.939, EP 616.812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6.403.630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6.333.348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6,767,541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 WO 11/076683 e WO 03/86467.

[00134] "Ativação de HER" se refere a ativação ou fosforilação de qualquer um ou mais receptores HER. Geralmente, a ativação de HER resulta em transdução de sinal (por exemplo, aquela causada por um domínio cinase intracelular de um receptor HER fosforilando resíduos de tirosina no receptor HER ou um polipeptídeo de substrato). A ativa-

ção de HER pode ser mediada por ligante HER ligando a um dímero HER compreendendo o receptor HER de interesse. O ligante HER ligando a um dímero HER pode ativar um domínio de cinase de um ou mais dos receptores HER no dímero e, desse modo, resulta em fosforilação de resíduos de tirosina em um ou mais dos receptores HER e/ou fosforilação de resíduos de tirosina em polipeptídeo(s) de substrato adicional(is), tal como cinases intracelulares Akt ou MAPK.

[00135] "Fosforilação" se refere à adição de um ou mais grupos fosfato a uma proteína, tal como um receptor HER, ou substrato do mesmo.

[00136] Um "sítio de ligação heterodimérico" em HER2 se refere a uma região no domínio extracelular de HER2 que contata, ou faz interface com, uma região no domínio extracelular de EGFR, HER3 ou HER4 mediante formação de um dímero com a mesma. A região é encontrada no Domínio II de HER2. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004).

[00137] Um anticorpo HER2 que "liga a um sítio de ligação heterodimérico" de HER2, liga a resíduos no domínio II (e opcionalmente também liga a resíduos em outro dos domínios do domínio extracelular HER2, tal como domínios I e III), e pode impedir estericamente pelo menos até certo grau a formação de um heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3, ou HER2-HER4. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004) caracteriza a estrutura de cristal HER2-pertuzumab depositada com o RCSB Protein Data Bank (ID Code IS78), ilustrando um anticorpo exemplar que liga ao sítio de ligação heterodimérico de HER2. Um anticorpo que "liga ao domínio II" de HER2 liga a resíduos no domínio II e, opcionalmente, resíduos em outro(s) domínio(s) de HER2, tal como domínios I e III.

[00138] "Isolado," quando usado para descrever os vários anticorpos divulgados neste documento, significa um anticorpo que foi identi-

ficado e separado e/ou recuperado de uma célula ou cultura de célula da qual ele foi expresso. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que tipicamente interfeririam com usos diagnósticos ou terapêuticos para o polipeptídeo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteínicos ou não proteínicos. Em modalidades preferidas, o anticorpo será purificado (1) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido N-terminal ou interna pelo uso de um sequenciador de copo de rotação, ou (2) até homogeneidade por SDS-PAGE em condições não redutoras ou redutoras usando azul Coomassie ou, preferivelmente, coloração prata. Anticorpo isolado inclui anticorpos in situ dentro de células recombinantes, porque pelo menos um componente do ambiente natural do polipeptídeo não estará presente. Ordinariamente, no entanto, polipeptídeo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[00139] Um "agente de detecção de câncer ErbB3" se refere a um agente que é capaz de detectar uma mutação associada com um câncer ErbB3 dentro de uma sequência de ácido nucleico ou sequência de aminoácido ERBB3. Tipicamente, o agente de detecção compreende um reagente capaz de ligar especificamente a uma sequência ERBB3. Em uma modalidade preferida, o reagente é capaz de ligar especificamente a uma mutação ErbB3 em uma sequência de ácido nucleico ERBB3. Em uma modalidade, o agente de detecção compreende um polinucleotídeo capaz de hibridizar especificamente a uma sequência de ácido nucleico ERBB3 (por exemplo, SEQ ID NO:1 ou 3). Em algumas modalidades, o polinucleotídeo é uma sonda compreendendo uma sequência de ácido nucleico que especificamente hibridiza a uma sequência ErbB3 compreendendo uma mutação. Em outra modalidade, o agente de detecção compreende um reagente capaz de ligar especificamente a uma sequência de ácido nucleico ERBB3. Em

outra modalidade, a sequência de aminoácido compreende uma mutação como descrito neste documento. Os agentes de detecção ainda podem compreender um marcador. Em uma modalidade preferida, o agente de detecção de câncer ErbB3 é um agente de detecção de câncer gastrointestinal ErbB3.

Mutações Somáticas ErbB3.

[00140] Em um aspecto, a invenção proporciona métodos para detectar a presença ou ausência de mutações somáticas ErbB3 associadas com câncer em uma amostra de um indivíduo, assim como métodos para diagnosticar e prognosticar câncer detectando a presença ou ausência de uma ou mais destas mutações somáticas em uma amostra de um indivíduo, em que a presença da mutação somática indica que o indivíduo tem câncer. Mutações somáticas ErbB3 associadas com risco de câncer foram identificadas usando estratégias incluindo estudos de associação no âmbito do genoma, triagens de modificador e triagem à base de família.

[00141] Mutações ou variações somáticas para uso nos métodos da invenção incluem variações em ErbB3, ou nos genes codificando esta proteína. Em algumas modalidades, a mutação sática é um DNA genômico que codifica um gene (ou sua região regulatória). Em várias modalidades, a mutação somática é uma substituição, uma inserção ou uma deleção em um ácido nucleico codificando para ErbB3 (SEQ ID NO: 1; N.º de Acesso NM_001982). Em uma modalidade, a variação é uma mutação que resulta em uma substituição de aminoácido em um ou mais de M60, G69, M91, V104, Y111, R135, R193, A232, P262, Q281, G284, V295, Q298, G325, T389, R453, M406, V438, D492, K498, V714, Q809, S846, E928, S1046, R1089, T1164 e D1194 na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO:2; N. de Acesso NP_001973). Em uma modalidade, a substituição é pelo menos uma de M60K, G69R, M91I, V104L, V104M, Y111C, R135L, R193*, A232V,

P262S, P262H, Q281H, G284R, V295A, Q298*, G325R, T389K, M406K, V438I, R453H, D492H, K498I, V714M, Q809R, S846I, E928G, S1046N, R1089W, T1164A e D1194E (* indica um códon de parada). Em várias modalidades, a pelo menos uma variação é uma substituição, inserção, truncagem ou deleção de aminoácidos em ErbB3. Em algumas modalidades, a variação é uma substituição de aminoácido.

Identificação de mutações de ErbB3

[00142] Em um aspecto significativo da presente invenção, um agrupamento de resíduos de aminoácido ErbB3 foi identificado como um hotspot mutacional. Em particular, concluiu-se que ErbB3 compreendendo pelo menos uma substituição na interface entre domínios I (posições 1 a 213 de SEQ ID NO:2) e II (posições 214 a 284 de SEQ ID NO:2) é indicativa de um câncer ErbB3. Em particular, um agrupamento de domínio extracelular notável (ECD) de mutações somáticas foi encontrado na interface de domínio I/II determinada pelo menos pelos resíduos de aminoácido ErbB3 104, 232 e 284. Em uma modalidade, o domínio ainda é determinado pelo resíduo de aminoácido 60. Em outra modalidade, o agrupamento de mutações somáticas inclui V104 a L ou M; A232 a V; e G284 a R. Em outra modalidade, o agrupamento ainda inclui M60 a K.

[00143] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos para determinar a presença de câncer gastrointestinal em um indivíduo em necessidade compreendendo detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo na presença ou ausência de uma mutação de aminoácido na interface, determinada pelas posições de aminoácido 104, 232 e 284, entre os domínios II e III de ErbB3 humano. A interface ainda pode ser determinada pela posição 60.

Detecção de Mutações Somáticas

[00144] Ácido nucleico, como usado em quaisquer dos métodos de detecção descritos neste documento, podem ser DNA genômico; RNA

transcrito de DNA genômico; ou cDNA gerado de RNA. Ácido nucleico pode ser derivado de um vertebrado, por exemplo, um mamífero. Um ácido nucleico é dito ser "derivado de" uma fonte particular se ele for obtido diretamente dessa fonte ou se se ele for uma cópia de um ácido nucleico encontrado nessa fonte.

[00145] Ácido nucleico inclui cópias do ácido nucleico, por exemplo, cópias que resultam de amplificação. Amplificação pode ser desejável em certos casos, por exemplo, a fim de obter uma quantidade desejada de material para detectar variações. Os amplicons podem, então, ser submetidos a um método de detecção de variação, tal como aqueles descritos abaixo, para determinar se uma variação está presente no amplicon.

[00146] Mutações ou variações somáticas podem ser detectadas por certos métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Esses métodos incluem, mas não se limitam a, sequenciamento de DNA; ensaios de extensão de iniciador, incluindo ensaios de incorporação de nucleotídeo específicos de mutação somática e ensaios de extensão de iniciador específicos de mutação somática (por exemplo, PCR específica de mutação somática, reação em cadeia de ligação específica de mutação somática (LCR), e gap-LCR); ensaios de hibridização de oligonucleotídeo específicos de mutação (por exemplo, ensaios de ligação de oligonucleotídeo); ensaios de proteção de clivagem nos quais a proteção de agentes de clivagem é usada para detectar bases descombinadas em duplexes de ácido nucleico; análise de ligação de proteína MutS; análise eletroforética comparando a mobilidade de moléculas de ácido nucleico variantes e tipo selvagem; eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE, como em, por exemplo, Myers et al. (1985) Nature 313:495); análise de clivagem de RNase em pares de base descombinados; análise de clivagem química ou enzimática de DNA heteroduplex; espectrometria de massa (por exemplo,

MALDI-TOF); análise de bit genético (GBA); ensaios de 5' nuclease (por exemplo, TaqManTM); e ensaios empregado faróis moleculares. Alguns destes métodos são discutidos em mais detalhes abaixo.

[00147] A detecção de variações em ácidos nucleicos alvos pode ser atingida por clonagem molecular e sequenciamento dos ácidos nucleicos alvo usando técnicas bem conhecidas na técnica. Alternativamente, técnicas de amplificação, tal como a reação em cadeia da polimerase (PCR), pode ser usadas para amplificar sequências de ácido nucleico alvo diretamente de uma preparação de DNA genômico de tecido de tumor. A sequência de ácido nucleico das sequências amplificadas pode, então, ser determinada e variações identificadas da mesma. Técnicas de amplificação são bem conhecidas na técnica, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase é descrita em Saiki et al., *Science* 239:487, 1988; Patentes US 4.683.203 e 4.683.195.

[00148] A reação em cadeia da ligase a qual é conhecida na técnica também pode ser usada para amplificar sequências de ácido nucleico alvo. Ver, por exemplo, Wu et al., *Genomics* 4:560-569 (1989). Além disso, uma técnica conhecida como PCR específica de alelo também pode ser modificada e usada para detectar mutações somáticas (por exemplo, substituições). Ver, por exemplo, Ruano e Kidd (1989) *Nucleic Acids Research* 17:8392; McClay et al. (2002) *Analytical Biochem.* 301:200-206. Em certas modalidades desta técnica, um iniciador específico de mutação é usado em que o nucleotídeo 3' terminal do iniciador é complementar a (isto é, capaz de especificamente emparelhar base com) uma variação particular no ácido nucleico alvo. Se a variação particular não estiver presente, um produto de amplificação não é observado. Amplification Refractory Mutation System (ARMS) também pode ser usado para detectar variações (por exemplo, substituições). ARMS é descrito, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente Europeu 0332435, e em Newton et al., *Nucleic Acids Research*, 17:7,

1989.

[00149] Outros métodos úteis para detectar variações (por exemplo, substituições) incluem, mas não se limitam a, (1) ensaios de incorporação de nucleotídeo específicos de mutação, tal como ensaios de extensão de base simples (ver, por exemplo, Chen et al. (2000) *Genome Res.* 10:549-557; Fan et al. (2000) *Genome Res.* 10:853-860; Pastinen et al. (1997) *Genome Res.* 7:606-614; e Ye et al. (2001) *Hum. Mut.* 17:305-316); (2) ensaios de extensão de iniciador específicos de mutação (ver, por exemplo, Ye et al. (2001) *Hum. Mut.* 17:305-316; e Shen et al. *Genetic Engineering News*, vol. 23, Mar. 15, 2003), incluindo PCR específica de alelo; (3) ensaios de 5' nuclease (ver, por exemplo, De La Vega et al. (2002) *BioTechniques* 32:S48-S54 (descrevendo o ensaio TaqMan.RTM.); Ranade et al. (2001) *Genome Res.* 11:1262-1268; e Shi (2001) *Clin. Chem.* 47:164-172); (4) ensaios empregando faróis moleculares (ver, por exemplo, Tyagi et al. (1998) *Nature Biotech.* 16:49-53; e Mhlanga et al. (2001) *Methods* 25:463-71); e (5) ensaios de ligação a oligonucleotídeo (ver, por exemplo, Grossman et al. (1994) *Nuc. Acids Res.* 22:4527-4534; Publicação de pedido de patente US 2003/0119004 A1; Publicação Internacional PCT WO 01/92579 A2; e Patente US 6.027.889).

[00150] Variações também podem ser detectadas por métodos de detecção de descombinação. Descombinações são duplexes de ácido nucleico hibridizado os quais não são 100% complementares. A falta de complementariedade total pode ser devida a deleções, inserções, inversões ou substituições. Um exemplo de um método de detecção de descombinação é o ensaio de Detecção de Reparo de Descombinação (MRD) descrito, por exemplo, em Faham et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:14717-14722 (2005) e Faham et al., *Hum. Mol. Genet.* 10:1657-1664 (2001). Outro exemplo de uma técnica de clivagem de descombinação é o método de proteção de RNase o qual é descrito

em detalhes em Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:7575, 1985, e Myers et al., Science 230:1242, 1985. Por exemplo, um método da invenção pode envolver o uso de uma ribossonda marcada a qual é complementar ao ácido nucleico alvo tipo selvagem humano. A ribossonda e o ácido nucleico alvo derivado da amostra de tecido são anelados (hibridizados) juntos e subsequentemente digeridos com a enzima RNase A a qual é capaz de detectar algumas descombinações em uma estrutura de RNA duplex. Se uma descombinação for detectada por RNase A, ela cliva no sítio da descombinação. Assim, quando a preparação de RNA anelado é separada em uma matriz de gel eletroforético, se uma descombinação tiver sido detectada e clivada por RNase A, um produto de RNA será visto o qual é menor do que o RNA duplex de comprimento total para a ribossonda e o mRNA ou DNA. A ribossonda não precisa ser do comprimento total do ácido nucleico alvo, mas pode ser uma porção do ácido nucleico alvo, contanto que ela englobe a posição suspeita de ter uma variação.

[00151] De uma maneira similar, sondas de DNA podem ser usadas para detectar descombinações, por exemplo, por meio de clivagem enzimática ou química. Ver, por exemplo, Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4397, 1988; e Shenk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:989, 1975. Alternativamente, descombinações podem ser detectadas por mudanças na mobilidade eletroforética de duplexes descombinados em relação a duplexes combinados. Ver, por exemplo, Cariello, Human Genetics, 42:726, 1988. Com cada uma das ribossondas ou sondas de DNA, o ácido nucleico alvo suspeito de compreender uma variação pode ser amplificado antes de hibridização. Mudanças em ácido nucleico alvo também podem ser detectadas usando hibridização Southern, especialmente se as mudanças forem rearranjos brutos, tal como deleções e inserções.

[00152] Sondas de polimorfismo de comprimento de fragmento de

restrição (RFLP) para o ácido nucleico alvo ou genes marcadores circundantes podem ser usados para detectar variações, por exemplo, inserções ou deleções. Inserções e deleções também pode ser detectadas clonagem, sequenciamento e amplificação de um ácido nucleico alvo. Análise de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) também pode ser usada para detectar variantes de mudança de base de um alelo. Ver, e.g. Orita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770, 1989, e *Genomics*, 5:874-879, 1989. SSCP pode ser modificada para a detecção de mutações somáticas de ErbB3. SSCP identifica diferenças de base por alteração em migração eletroforética de produtos PCR de fita simples. Produtos PCR de fita simples podem ser gerados aquecendo, ou de outro modo, desnaturando produtos PCR de fita dupla. Ácidos nucleicos de fita dupla podem redobrar ou formar estruturas secundárias que são parcialmente dependentes da sequência de base. As diferentes mobilidades eletroforéticas de produtos de amplificação de fita dupla estão relacionadas a diferenças de sequência de base em posições SNP. Eletroforese de gel de gradiente de desnaturação (DGGE) diferencia alelos SNP com base nas estabilidades dependentes de sequência diferentes e propriedades de fusão inerentes em DNA polimórfico e nas diferenças correspondentes em padrões de migração eletroforética em um gel de gradiente de desnaturação.

[00153] Mutações ou variações somáticas também pode ser detectadas com o uso de micromatrizes. Uma micromatriz é uma tecnologia multiplex que tipicamente usa uma série em matriz de milhares de sondas de ácido nucleico para hibridizar com, por exemplo, uma amostra de cDNA ou cRNA em condições de alta restrição. Hibridização de alvo de sonda é tipicamente detectada e quantificada por detecção de alvos marcados com fluoróforo, prata ou de quimioluminescência para determinar abundância relativa de sequências de ácido nucleico no

alvo. Em micromatrizes típicas, as sondas são fixadas a uma superfície sólida por uma ligação covalente a uma matriz química (via epóxi-silano, amino-silano, lisina, poliacrilamida ou outros). A superfície sólida é, por exemplo, vidro, um chip de silício ou contas microscópicas. Várias micromatrizes estão comercialmente disponíveis, incluindo aquelas fabricadas, por exemplo, por Affymetrix, Inc. e Illumina, Inc.

[00154] Outro método para a detecção de mutações somáticas é baseado em espectrometria de massa. Espectrometria de massa tira vantagem da massa única de cada um dos quatro nucleotídeo de DNA. Os ácidos nucleicos ErbB3 contendo mutação potenciais podem analisados de modo não ambíguo por espectrometria de massa medindo as diferenças na massa de ácidos nucleicos tendo uma mutação somática. Tecnologia de espectrometria de massa MALDI-TOF (Tempo de Voo de Ionização de Dessorção a Laser Assistida por Matriz) é útil para determinações extremamente precisas de massa molecular, tal como os ácidos nucleicos contendo uma mutação somática. Números enfoques para análise de ácido nucleico foram desenvolvidos com base em espectrometria de massa. Métodos à base de espectrometria de massa exemplares incluem ensaios de extensão de iniciador os quais também podem ser utilizados em combinação com outros enfoques, tal como formatos e micromatrizes à base de gel tradicionais.

[00155] Ribozimas específicas de sequência (Patente US 5.498.531) também podem ser usadas para detectar mutações somáticas com base no desenvolvimento ou na perda de um sítio de clivagem de ribozima. Sequências perfeitamente combinadas podem ser distinguidas de sequências descombinadas por ensaios de digestão de clivagem de nuclease ou por diferenças em temperatura de fusão. Se a mutação afetar um sítio de clivagem de enzima de restrição, a mutação pode ser identificada por alterações em padrões de digestão de enzima de restrição e as mudanças correspondentes em comprimen-

tos de fragmento de ácido nucleico determinadas por eletroforese de gel.

[00156] Em outras modalidades da invenção, técnicas de detecção à base de proteína são usadas para detectar proteínas variantes codificadas pelos genes tendo variações genéticas como divulgado neste documento. A determinação da presença da forma variante da proteína pode ser executada usando qualquer técnica adequada conhecida na técnica, por exemplo, eletroforese (por exemplo, eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante ou não desnaturante, 2-eletroforese de gel dimensional, eletroforese capilar e isoeletrofocalização), cromatografia (por exemplo, cromatografia de dimensionamento, cromatografia líquida de alta desempenho (HPLC) e HPLC de troca catiônica) e espectroscopia de massa (por exemplo, espectroscopia de massa MALDI-TOF, espectroscopia de massa de ionização de eletropulverização (ESI) e espectroscopia de massa em tandem). Ver, por exemplo, Ahrer e Jungabauer (2006) *J. Chromatog. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 841: 110-122; e Wada (2002) *J. Chromatog. B.* 781: 291-301). Técnicas adequadas podem ser escolhidas com base em parte na natureza da variação a ser detectada. Por exemplo, variações resultantes em substituições de aminoácido onde o aminoácido substituído tem uma carga diferente do aminoácido original podem ser detectadas por focalização isoeletrica. Focalização isoeletrica do polipeptídeo através de um gel tendo um gradiente de pH a altas voltagens separa proteínas por seu pI. O gel de gradiente de pH pode ser comparado a um gel simultaneamente em passagem contendo a proteína tipo selvagem. Em casos em que a variação resulta na geração de um novo sítio de clivagem proteolítica, ou na abolição de um existente, a amostra pode ser submetida a digestão proteolítica seguida por mapeamento de peptídeo usando uma técnica eletroforética, cromatográfica ou de espectroscopia de massa apropriada. A presença de uma variação

também pode ser detectada usando técnicas de sequenciamento de proteína, tal como degradação Edman ou certas formas de espectroscopia de massa.

[00157] Métodos conhecidos na técnica usando combinações destas técnicas também podem se usados. Por exemplo, na técnica de espectroscopia de massa em tandem de microscopia HPLC, digestão proteolítica é realizada em uma proteína e a mistura de peptídeo resultante é separada por separação cromatográfica de fase reversa. Espectroscopia de massa em tandem é, então, realizada e os dados coletados da mesma são analisados. (Gatlin et al. (2000) Anal. Chem., 72:757-763). Em outro exemplo, eletroforese de gel não desnaturante é combinada com espectroscopia de massa MALDI (Mathew et al. (2011) Anal. Biochem. 416: 135-137).

[00158] Em algumas modalidades, a proteína pode ser isolada da amostra usando um reagente, tal como anticorpo ou peptídeo que especificamente liga a proteína, e, então, ainda analisada para determinar a presença ou ausência da variação genética usando qualquer uma das técnicas divulgadas acima.

[00159] Alternativamente, a presença da proteína variante em uma amostra pode ser detectada por ensaios de imunoafinidade com base em anticorpos específicos para proteínas tendo variações genéticas de acordo com a presente invenção, isto é, anticorpos os quais especificamente ligam à proteína tendo a variação, mas não a uma forma da proteína a qual carece da variação. Tais anticorpos podem ser produzidos por qualquer técnica adequada conhecida na técnica. Anticorpos podem ser usados para imunoprecipitar proteínas específicas de amostras de solução ou para imunoblotar proteínas separadas por, por exemplo, géis de poliacrilamida. Métodos imunocitoquímicos também podem ser usados na detecção de variantes de proteína específica em tecidos ou células. Outras técnicas à base de anticorpo bem conheci-

das também podem ser usadas incluindo, por exemplo, ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), radioimuno-ensaio (RIA), ensaios imunoradiométricos (IRMA) e ensaios imunoenzimáticos (IEMA), incluindo ensaios em sanduíche usando anticorpos monoclonais ou policlonais. Ver, por exemplo, Patentes US 4.376.110 e 4.486.530.

Identificação de Marcadores Genéticos

[00160] A relação entre mutações somáticas e mutações de linha germinal foi investigada em câncer (ver, por exemplo, Zauber et al. J. Pathol. 2003 Feb;199(2):146-51). As mutações somáticas ErbB3 divulgadas neste documento são úteis para identificar marcadores genéticos associados com o desenvolvimento de câncer. Por exemplo, as mutações somáticas divulgadas neste documento podem ser usadas para identificar polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) na linha germinal e quaisquer SNPs adicionais que estejam em desequilíbrio de ligação. De fato, qualquer SNP adicional em desequilíbrio de ligação com um primeiro SNP associado com câncer será associado com câncer. Uma vez que a associação tenha sido demonstrada entre um dado SNP e câncer, a descoberta de SNPs adicionais associados com câncer pode ser de grande interesse a fim de aumentar a densidade de SNPs nesta região particular.

[00161] Métodos para identificar SNPs adicionais e conduzir análise de desequilíbrio de ligação são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a identificação de SNPs adicionais em desequilíbrio de ligação com os SNPs divulgados neste documento pode envolver as etapas de: (a) amplificar um fragmento da região genômica compreendendo ou circundando um primeiro SNP de uma pluralidade de indivíduos; (b) identificação de segundos SNPs na região genômica alojando ou circundando o dito primeiro SNP; (c) conduzir uma análise de desequilíbrio de ligação entre o dito primeiro SNP e segundos SNPs; e (d) selecionar os ditos segundos SNPs como estando em desequilíbrio de li-

gação com o dito primeiro marcado. Este método pode ser modificado para incluir certas etapas precedendo a etapa (a), tal como amplificação de um fragmento da região genômica compreendendo ou circundando uma mutação somática de uma pluralidade de indivíduos e identificação de SNPs na região genômica alojando ou circundando a dita mutação somática.

Agentes de Detecção de Câncer ErbB3

[00162] Em um aspecto, a presente invenção proporciona agentes de detecção de câncer ErbB3. Em uma modalidade, o agente de detecção compreende um reagente capaz de ligar especificamente a uma sequência ErbB3 mostrada na Figura 39 (sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:3). Em outra modalidade, o agente de detecção compreende um polinucleotídeo capaz de hibridizar especificamente a uma sequência de ácido nucleico ERBB3 mostrada na Figura 2 (SEQ ID NO: 1) ou Figura 39 (SEQ ID NO:3). Em uma modalidade preferida, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico que especificamente hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 compreendendo uma mutação mostrada na Figura 39 (SEQ ID NO:3).

[00163] Em outro aspecto, o agente de detecção de câncer ErbB3 compreende um polinucleotídeo tendo uma fórmula particular. Em uma modalidade, a fórmula de polinucleotídeo é

[00164] $5' \quad X_a-Y-Z_b \quad 3'$ Fórmula I,

[00165] em que

[00166] X é um ácido nucleico e a está entre cerca de 0 e cerca de 250 (isto é, na direção 5');

[00167] Y representa um códon de mutação ErbB3; e

[00168] Z é um ácido nucleico e b está entre cerca de 0 e cerca de 250 (isto é, na direção 3');

[00169] Em outra modalidade, a ou b é de cerca de 250 ou menos

na direção 5' (se a) ou 3' (se b). Em algumas modalidades, a ou b está entre cerca de 0 e cerca de 250, a ou b está entre cerca de 0 e cerca de 245, cerca de 0 e cerca de 240, está entre cerca de 0 e cerca de 230, está entre cerca de 0 e cerca de 220, está entre cerca de 0 e cerca de 210, está entre cerca de 0 e cerca de 200, está entre cerca de 0 e cerca de 190, está entre cerca de 0 e cerca de 180, está entre cerca de 0 e cerca de 170, está entre cerca de 0 e cerca de 160, está entre cerca de 0 e cerca de 150, está entre cerca de 0 e cerca de 140, está entre cerca de 0 e cerca de 130, está entre cerca de 0 e cerca de 120, está entre cerca de 0 e cerca de 110, está entre cerca de 0 e cerca de 100, está entre cerca de 0 e cerca de 90, está entre cerca de 0 e cerca de 80, está entre cerca de 0 e cerca de 70, está entre cerca de 0 e cerca de 60, está entre cerca de 0 e cerca de 50, está entre cerca de 0 e cerca de 45, está entre cerca de 0 e cerca de 40, está entre cerca de 0 e cerca de 35, está entre cerca de 0 e cerca de 30, está entre cerca de 0 e cerca de 25, está entre cerca de 0 e cerca de 20, está entre cerca de 0 e cerca de 15, está entre cerca de 0 e cerca de 10, ou está entre cerca de 0 e cerca de 5.

[00170] Em outra modalidade, a ou b é de cerca de 35 ou menos. Em algumas modalidades, a ou b está entre cerca de 0 e cerca de 35, está entre cerca de 0 e cerca de 34, está entre cerca de 0 e cerca de 33, está entre cerca de 0 e cerca de 32, está entre cerca de 0 e cerca de 31, está entre cerca de 0 e cerca de 30, está entre cerca de 0 e cerca de 29, está entre cerca de 0 e cerca de 28, está entre cerca de 0 e cerca de 27,

[00171] entre cerca de 0 e cerca de 26, está entre cerca de 0 e cerca de 25, está entre cerca de 0 e cerca de 24, está entre cerca de 0 e cerca de 23, está entre cerca de 0 e cerca de 22, está entre cerca de 0 e cerca de 21, está entre cerca de 0 e cerca de 20, está entre cerca de 0 e cerca de 19, está entre cerca de 0 e cerca de 18, está entre cerca

de 0 e cerca de 17, está entre cerca de 0 e cerca de 16, está entre cerca de 0 e cerca de 15, está entre cerca de 0 e cerca de 14, está entre cerca de 0 e cerca de 13, está entre cerca de 0 e cerca de 12, está entre cerca de 0 e cerca de 11, está entre cerca de 0 e cerca de 10, está entre cerca de 0 e cerca de 9, está entre cerca de 0 e cerca de 8, está entre cerca de 0 e cerca de 7, está entre cerca de 0 e cerca de 6, está entre cerca de 0 e cerca de 5, está entre cerca de 0 e cerca de 4, está entre cerca de 0 e cerca de 3, ou está entre cerca de 0 e cerca de 2.

[00172] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 60 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em AAA e AAG. Isto corresponde à mutação M60K associada com câncer de cólon.

[00173] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 104 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em ATG, CTT, CTC, CTA, CTG, TTA e TTG. Isto corresponde à mutação V104M ou V104L associada com câncer de cólon, gástrico, ovariano e de mama.

[00174] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 111 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em TGT e TGC. Isto corresponde à mutação Y111C associada com câncer gástrico.

[00175] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 135 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em CTT, CTC, CTA, CTG, TTA e TTG. Isto corresponde à mutação R135L associada com câncer gástrico.

[00176] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 93 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em TAA, TAG e TGA. Isto corresponde à mutação R193* (onde * é um códon de parada) associada com câncer de cólon.

[00177] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 232 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em GTT, GTC, GTA e GTG. Isto corresponde à mutação A232V associada com câncer gástrico.

[00178] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 262 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em CAT, CAC, TCT, TCC, TCA, TCG, AGT e AGC. Isto corresponde à mutação P262H ou P262S associada com câncer de cólon e/ou gástrico.

[00179] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 284 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em CGT, CGC, CGA, CGG, AGA e AGG. Isto corresponde à mutação G284R associada com câncer de cólon ou de pulmão (adenocarcinoma NSCLC).

[00180] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 295 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em GCT, GCC, GCA e GCG. Isto corresponde à mutação V295A associada com câncer de cólon.

[00181] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 325 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo

do em CGT, CGC, CGA, CGG, AGA e AGG. Isto corresponde à mutação G325R associada com câncer de cólon.

[00182] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 406 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em ACT, ACC, ACA, ACG, AAA e AAG. Isto corresponde à mutação M406K ou M406T associada com câncer gástrico.

[00183] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 453 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em CAT e CAC. Isto corresponde à mutação R453H associada com câncer gástrico.

[00184] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 498 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em ATT, ATC e ATA. Isto corresponde à mutação K498I associada com câncer gástrico.

[00185] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 809 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em CGT, CGC, CGA, CGG, AGA e AGG. Isto corresponde à mutação Q809R associada com câncer gástrico.

[00186] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 846 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em ATT, ATC e ATA. Isto corresponde à mutação S846I associada com câncer de cólon.

[00187] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 928 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo

do em GGT, GGC, GGA e GGG. Isto corresponde à mutação E928G associada com câncer gástrico e câncer de mama.

[00188] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 1089 de SEQ ID NO:2, em que Y é TGG. Isto corresponde à mutação R1089W associada com câncer gástrico.

[00189] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 1164 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em GCT, GCC, GCA e GCG. Isto corresponde à mutação T1164A associada com câncer de cólon.

[00190] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 492 de SEQ ID NO:2, em que Y é selecionado do grupo consistindo em CAT e CAC. Isto corresponde à mutação D492H associada com câncer de pulmão (adenocarcinoma NSCLC).

[00191] Em outra modalidade, o polinucleotídeo hibridiza a uma sequência de ácido nucleico ErbB3 codificando um aminoácido na posição 714 de SEQ ID NO:2, em que Y é ATG. Isto corresponde à mutação V714M associada com câncer de pulmão (carcinoma escamoso NSCLC).

Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Câncer

[00192] A invenção proporciona métodos para o diagnóstico ou prognóstico de câncer em um indivíduo detectando a presença em uma amostra do indivíduo de uma ou mais mutações ou variações somáticas associadas com câncer como divulgados neste documento. Mutações ou variações somáticas para uso nos métodos da invenção incluem variações em ErbB3, ou nos genes codificando esta proteína. Em algumas modalidades, a mutação sática é um DNA genômico que codifica um gene (ou sua região regulatória). Em várias modalidades, a

mutação somática é uma substituição, uma inserção ou uma deleção no gene codificando ErbB3. Em uma modalidade, a variação é uma mutação que resulta em uma substituição de aminoácido em uma ou mais de M60, G69, M91, V104, Y111, R135, R193, A232, P262, Q281, G284, V295, Q298, G325, T389, M406, V438, R453, D492, K498, V714, Q809, S846, E928, S1046, R1089, T1164 e D1194 na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO:2). Em uma modalidade, a substituição é pelo menos uma de M60K, G69R, M91I, V104L, V104M, Y111C, R135L, R193*, A232V, P262S, P262H, Q281H, G284R, V295A, Q298*, G325R, T389K, M406K, V438I, R453H, D492H, K498I, V714M, Q809R, S846I, E928G, S1046N, R1089W, T1164A e D1194E (* indica um códon de parada) na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO:2). Em uma modalidade, a mutação indica a presença de um câncer ErbB3 selecionado do grupo consistindo em gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, colorretal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma escamoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), câncer de pulmão e câncer pancreático.

[00193] Em uma modalidade, a variação é uma mutação que resulta em uma substituição de aminoácido em uma ou mais de M60, V104, Y111, R153, R193, A232, P262, V295, G325, M406, R453, D492, K498, V714, Q809, R1089 e T1164 na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO:2). Em outra modalidade, a substituição é pelo menos uma de M60K, V104M, V104L, Y111C, R153L, R193*, A232V, P262S, P262H, V295A, G325R, M406K, R453H, D492H, K498I, V714M, Q809R, R1089W e D1194E (* indica um códon de parada) na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO:2). Em uma modalidade, a mutação indica a presença de um câncer ErbB3 selecionado do grupo consistindo em gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, co-

lorretal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma escamoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), câncer de pulmão e câncer pancreático.

[00194] Em outra modalidade, a variação é uma mutação que resulta em uma substituição de aminoácido em uma ou mais de V104, Y111, R153, A232, P262, G284, T389, R453, K498 e Q809 na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO:2). Em outra modalidade, a substituição é pelo menos uma de V104L, V104M, Y111C, R153L, A232V, P262S, P262H, G284R, T389K, R453H, K498I e Q809R na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO:2). Em uma modalidade, a mutação ErbB3 indica a presença de câncer gastrointestinal. Em outra modalidade, um câncer gastrointestinal é um ou mais de câncer gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal e colorretal.

[00195] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em M60. Em outra modalidade, a substituição é M60K. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de cólon.

[00196] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em V104. Em outra modalidade, a substituição é V104L ou V104M. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico ou câncer de cólon.

[00197] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em V111. Em outra modalidade, a substituição é V111C. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico.

[00198] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em R135. Em outra modalidade, a substituição é R135L. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico.

[00199] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em R193. Em outra modalidade, a substituição é R193*. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de cólon.

[00200] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em A232. Em outra modalidade, a substituição é A232V. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico.

[00201] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em P262. Em outra modalidade, a substituição é P262S ou P262H. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de cólon ou câncer gástrico.

[00202] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em G284. Em outra modalidade, a substituição é G284R. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de pulmão (adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC) ou câncer de cólon.

[00203] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em V295. Em outra modalidade, a substituição é V295A. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de cólon.

[00204] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em G325. Em outra modalidade, a substituição é G325R. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de cólon.

[00205] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em M406. Em outra modalidade, a substituição é M406K. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico.

[00206] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em R453. Em outra modalidade, a substituição é R453H. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico ou câncer de cólon.

[00207] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em K498. Em outra modalidade, a substituição é K498I. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico.

[00208] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em D492. Em outra modalidade, a substituição é D492H. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de pulmão (adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC)).

[00209] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em V714. Em outra modalidade, a substituição é V714M. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de pulmão (carcinoma escamoso de pulmão de célula não pequena (NSCLC)).

[00210] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em Q809. Em outra modalidade, a substituição é Q809R. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico.

[00211] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em S846. Em outra modalidade, a substituição é S846I. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de cólon.

[00212] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em R1089. Em outra modalidade, a substituição é R1089W. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer gástrico.

[00213] Em uma modalidade, a substituição ErbB3 está em T1164. Em outra modalidade, a substituição é T1164A. Em outra modalidade, a mutação indica a presença de câncer de cólon.

[00214] Em várias modalidades, a pelo menos uma variação é uma substituição, inserção, truncagem ou deleção de aminoácidos em ErbB3. Em algumas modalidades, a variação é uma substituição de aminoácido. Qualquer uma ou mais destas variações pode ser usada em qualquer um dos métodos de detecção, diagnóstico e prognóstico descritos abaixo.

[00215] Em uma modalidade, a invenção proporciona um método para detectar a presença ou ausência de uma mutação somática indicativa de câncer em um indivíduo compreendendo: (a) contatar uma amostra do indivíduo com um reagente capaz de detectar a presença ou ausência de uma mutação somática em um gene ErbB3; e (b) determinar a presença ou ausência da mutação, em que a presença da mutação indica que o indivíduo é afligido com, ou está em risco de desenvolver, câncer.

[00216] O reagente para uso no método pode ser um oligonucleotídeo, uma sonda de DNA, uma sonda de RNA e uma ribozima. Em algumas modalidades, o reagente é marcado. Marcadores podem incluir, por exemplo, marcadores de radioisótopo, marcadores fluorescentes, marcadores bioluminescentes ou marcadores enzimáticos. Radionuclídeos que podem servir como marcadores detectáveis incluem, por exemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 e Pd-109.

[00217] Também é previsto um método para detectar uma mutação somática indicativa de câncer em um indivíduo compreendendo: determinar a presença ou ausência de uma mutação somática em um gene ErbB3 em uma amostra biológica de um indivíduo, em que a presença da mutação indica que o indivíduo é afligido com, ou está em risco de desenvolver, câncer. Em várias modalidades do método, a detecção da presença de uma ou mais mutações somáticas é realizada por um processo selecionado do grupo consistindo em sequenciamento direto, hibridização de sonda específica de mutação, extensão de iniciador específica de mutação, amplificação específica de mutação, incorporação de nucleotídeo específica de mutação, digestão de nuclease 5', ensaio de farol molecular, ensaio de ligação de oligonucleotídeo, análise de tamanho e polimorfismo de conformação de fita simples. Em algumas modalidades, ácidos nucleicos da amostra são amplificados antes de determinar a presença das uma ou mais mutações.

[00218] A invenção ainda fornece um método para diagnosticar ou prognosticar câncer em um indivíduo compreendendo: (a) contatar uma amostra do indivíduo com um reagente capaz de detectar a presença ou ausência de uma mutação somática em um gene ErbB3; e (b) determinar a presença ou ausência da mutação, em que a presença da mutação indica que o indivíduo é afligido com, ou está em risco

de desenvolver, câncer.

[00219] A invenção ainda fornece um método para diagnosticar ou prognosticar câncer em um indivíduo compreendendo: determinar a presença ou ausência de uma mutação somática em um gene ErbB3 em uma amostra biológica de um indivíduo, em que a presença da variação genética indica que o indivíduo é afligido com, ou está em risco de desenvolver, câncer.

[00220] A invenção também fornece um método para diagnosticar ou prognosticar câncer em um indivíduo compreendendo: (a) obter uma amostra contendo ácido nucleico do indivíduo e (b) analisar a amostra para detectar a presença de pelo menos uma mutação somática em um gene ErbB3, em que a presença da variação genética indica que o indivíduo é afligido com, ou está em risco de desenvolver, câncer.

[00221] Em algumas modalidades, o método para diagnosticar ou prognosticar ainda compreende submeter o indivíduo a um ou mais testes diagnósticos adicionais para câncer, por exemplo, triagem para um ou mais marcadores adicionais ou submeter o indivíduo a procedimentos de imageamento.

[00222] É ainda contemplado que qualquer um dos métodos acima pode ainda compreender tratar o indivíduo para câncer com base nos resultados do método. Em algumas modalidades, os métodos acima ainda compreendem detectar na amostra a presença de pelo menos uma mutação somática. Em uma modalidade, a presença de uma primeira mutação somática junto com a presença de pelo menos uma mutação somática adicional é indicativa de um risco elevado de câncer em comparação com um indivíduo tendo a primeira mutação somática e carecendo da presença da pelo menos uma mutação somática adicional.

[00223] Também é previsto um método para identificar um indivíduo

tendo um risco elevado do diagnóstico de câncer compreendendo: (a) determinar a presença ou ausência de uma primeira mutação somática em um gene ErbB3 em uma amostra biológica de um indivíduo; e (b) determinar a presença ou ausência de pelo menos uma mutação somática adicional, em que presença da primeira e de pelo menos uma mutação somática adicional indica que o indivíduo tem um risco elevado do diagnóstico de câncer em comparação com um indivíduo carecendo da presença da primeira e de pelo menos uma mutação somática adicional.

[00224] Também é previsto um método para auxiliar o diagnóstico e/ou prognóstico de um subfenótipo de câncer em um indivíduo, o método compreendendo detectar em uma amostra biológica derivada do indivíduo a presença de uma mutação somática em um gene codificando ErbB3. Em uma modalidade, a mutação somática resulta na substituição de aminoácido G284R na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO: 2), e o subfenótipo de câncer é caracterizado pelo menos em parte por sinalização independente de ligante de HER de uma célula expressando o ErbB3 mutante G284R. Em outra modalidade, a mutação somática resulta na substituição de aminoácido Q809R na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO: 2), e o subfenótipo de câncer é caracterizado pelo menos em parte por sinalização independente de ligante de HER de uma célula expressando o ErbB3 mutante Q809R.

[00225] A invenção ainda fornece um método para prever a resposta de um indivíduo a um agente terapêutico de câncer que tem como alvo um receptor ErbB compreendendo detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo uma mutação somática que resulta em uma variação de aminoácido na sequência de aminoácido de ErbB3 (SEQ ID NO: 2), em que a presença da mutação somática é indicativa de uma resposta a um agente terapêutico que tem como alvo um re-

ceptor ErbB. Em uma modalidade, o agente terapêutico é um antagonista ou agente de ligação de ErbB, por exemplo, um anticorpo anti-ErbB.

[00226] Uma amostra biológica para uso em qualquer um dos métodos descritos acima pode ser obtida usando certos métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Amostras biológicas podem ser obtidas de animais vertebrados e, em particular, mamíferos. Em certas modalidades, uma amostra biológica compreende uma célula ou tecido. Variações nos ácido nucleicos alvo (ou polipeptídeos codificados) podem ser detectadas de uma amostra de tecido ou de outras amostras corporais, tal como sangue, soro, urina, esputo, saliva, mucosa e tecido. Ao triar tais amostras corporais, um diagnóstico precoce simples pode ser obtido para doenças tais como câncer. Além disso, o progresso da terapia pode ser monitorado mais facilmente testando essas amostras corporais para variações em ácidos nucleicos alvo (ou polipeptídeos codificados). Em algumas amostras, a amostra biológica é obtida de um indivíduo suspeito de ter câncer.

[00227] Subsequente à determinação de que um indivíduo ou uma amostra biológica obtida do indivíduo compreende uma mutação somática divulgada neste documento é contemplado que uma quantidade eficaz de um agente terapêutico de câncer apropriado pode ser administrada ao indivíduo para tratar câncer no indivíduo.

[00228] Também são fornecidos métodos para auxiliar no diagnóstico de câncer em um mamífero detectando a presença de uma ou mais variações em ácido nucleico compreendendo uma mutação somática em ErbB3, de acordo com o método descrito acima.

[00229] Em outra modalidade, um método é fornecido para prever se um indivíduo com câncer responderá a um agente terapêutico determinando se o indivíduo compreende uma mutação somática em ErbB3, de acordo com o método descrito acima.

[00230] Também são fornecidos métodos para avaliar predisposição de um indivíduo para desenvolver câncer detectando a presença ou ausência no indivíduo de uma mutação somática em ErbB3.

[00231] Também são fornecidos métodos para subclassificar câncer em um mamífero, o método compreendendo detectar a presença de uma mutação somática em ErbB3.

[00232] Também são fornecidos métodos para identificar um agente terapêutico eficaz para tratar câncer em uma subpopulação de pacientes, o método compreendendo correlacionar eficácia do agente com a presença de uma mutação somática em ErbB3.

[00233] Métodos adicionais proporcionam informação útil para determinar etapas de intervenção clínica apropriadas, se e como apropriado. Portanto, em uma modalidade de um método da invenção o método ainda compreende uma etapa de intervenção clínica com base em resultados da avaliação da presença ou ausência de uma mutação somática ErbB3 associada com câncer como divulgado neste documento. Por exemplo, intervenção apropriada pode envolver etapas profiláticas e de tratamento, ou ajuste(s) de quaisquer etapas profiláticas ou de tratamento então correntes com base em informação genética obtida por um método da invenção.

[00234] Como seria evidente para alguém versado na técnica, em qualquer método descrito neste documento, embora a detecção da presença de uma mutação somática indicasse positivamente uma característica de uma doença (por exemplo, presença ou subtipo de uma doença), a não detecção de uma mutação somática também seria informativa fornecendo caracterização recíproca da doença.

[00235] Mais ainda, os métodos incluem métodos para tratar câncer em um mamífero compreendendo as etapas de obter uma amostra biológica do mamífero, examinar a amostra biológica para a presença ou ausência de uma mutação somática ErbB3 conforme divulgado

neste documento e, mediante determinação da presença ou ausência da mutação na dita amostra de tecido ou célula, administrar uma quantidade eficaz de um agente terapêutico apropriado ao dito mamífero. Opcionalmente, os métodos compreendem administrar uma quantidade eficaz de um agente terapêutico de câncer de alvo ao dito mamífero.

[00236] Também são fornecidos métodos para tratar câncer em um indivíduo em quem uma mutação somática ErbB3 é conhecida por estar presente, o método compreendendo administrar ao indivíduo um agente terapêutico eficaz para tratar câncer.

[00237] Também são fornecidos métodos para tratar um indivíduo tendo câncer, o método compreendendo administrar ao indivíduo um agente terapêutico previamente demonstrado ser eficaz para tratar o dito câncer em pelo menos um estudo clínico, em que o agente foi administrado a pelo menos cinco indivíduos humanos que tinham cada qual uma mutação somática ErbB3. Em uma modalidade, os pelo menos cinco indivíduos tinham duas ou mais mutações somáticas diferentes no total para o grupo de pelo menos cinco indivíduos. Em uma modalidade, os pelo menos cinco indivíduos tinham as mesmas mutações somáticas para o grupo inteiro de pelo menos cinco indivíduos.

[00238] Também são fornecidos métodos para tratar um indivíduo de câncer que é de uma subpopulação de pacientes de câncer específica compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente terapêutico que é aprovado como um agente terapêutico para a dita subpopulação, em que a subpopulação é caracterizada pelo menos em parte por associação com uma mutação somática ErbB3.

[00239] Em uma modalidade, a subpopulação é de ancestrais Europeus. Em uma modalidade, a invenção fornece um método compreendendo fabricar um agente terapêutico de câncer e empacotar o agente com instruções para administrar o agente a um indivíduo que

tem ou se acredita ter câncer e que tem uma mutação somática ErbB3.

[00240] Também são fornecidos métodos para selecionar um paciente sofrendo de câncer para tratamento com um agente terapêutico de câncer compreendendo detectar a presença de uma mutação somática ErbB3.

[00241] Um agente terapêutico para o tratamento de câncer pode ser incorporado em composições as quais, em algumas modalidades, são adequadas para uso farmacêutico. Essas composições tipicamente compreendem o peptídeo ou polipeptídeo e um transportador aceitável, por exemplo, um que é farmacêuticamente aceitável. Um "transportador farmacêuticamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo de absorção e similares, compatíveis com administração farmacêutica (Gennaro, Remington: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2000)). Exemplos de tais transportadores ou diluentes incluem, mas não estão limitados a, água, salina, soluções de Finger, solução de dextrose e albumina sérica humana a 5%. Lipossomas e veículos não aquosos, tal como óleos fixos, também podem ser usados. Exceto quando uma mídia ou um agente convencional é incompatível com um composto ativo, o uso destas composições é contemplado. Compostos ativos suplementares também podem ser incorporados às composições.

[00242] Um agente terapêutico da invenção (e qualquer agente terapêutico adicional para o tratamento de câncer) pode ser administrado por qualquer meio adequado incluindo parenteral, intrapulmonar, intratecal e intranasal e, se desejado para tratamento local, administração intralesional. Infusões parenterais incluem, por exemplo, administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. A dosagem pode ser por qualquer rota adequada, *por exem-*

p/lo, por injeções, tal como injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte se a administração é breve ou crônica. Vários programas de dosagem incluindo, mas não limitados a, administrações simples ou múltiplas por vários pontos no tempo, administração de bolus e infusão por pulso são contemplados neste documento.

[00243] Dosagens e programas eficazes para administração de agentes terapêuticos de câncer podem ser determinados empiricamente, e fazer essas determinações está dentro da habilidade na técnica. Dosagens simples ou múltiplas podem ser empregadas. Quando a administração *in vivo* de um agente terapêutico de câncer é empregada, as quantidades de dosagem normais podem variar de cerca de 10 ng/kg até 100 mg/kg de peso corporal do mamífero ou mais por dia, preferivelmente cerca de 1 µg/kg/dia a 10 mg/kg/dia, dependendo da rota de administração. Diretrizes quanto às dosagens e aos métodos particulares de distribuição são fornecidas na literatura; ver, por exemplo, Patentes US 4.657.760; 5.206.344; ou 5.225.212.

[00244] Um aspecto da invenção proporciona um método para tratar um indivíduo tendo um câncer HER3/ErbB3 identificado por uma ou mais das mutações somáticas descritas neste documento. Em uma modalidade, o método compreende a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um inibidor HER. Em outra modalidade, o inibidor HER é um anticorpo o qual liga a um receptor HER. Em uma modalidade preferida, o anticorpo liga a um receptor ErbB3. Em uma modalidade, o anticorpo HER é um anticorpo multiespecífico compreendendo um domínio de ligação a antígeno que especificamente liga a HER3 e pelo menos um receptor HER adicional, tal como aqueles descritos em Fuh *et al.* WO10/108127 incorporado neste documento por referência em sua totalidade. Em uma modalidade, o câncer ErbB3 tratado pelo inibidor HER compreende células que expressam HER3. Em uma modalidade, o câncer tratado pelo inibidor HER é cân-

cer gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, colorretal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma escamoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), câncer de pulmão e câncer pancreático.

[00245] Outro aspecto da invenção fornecer um método para inibir uma atividade biológica de um receptor HER em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um inibidor HER. Em uma modalidade, o receptor HER é um receptor HER3 expresso por células de câncer no indivíduo. Em outra modalidade, o inibidor HER é um anticorpo HER compreendendo um domínio de ligação a antígeno que especificamente liga a pelo menos HER3.

[00246] Um aspecto da invenção proporciona um anticorpo HER para uso como um medicamento. Outro aspecto da invenção proporciona um anticorpo HER para uso na fabricação de um medicamento. O medicamento pode ser usado, em uma modalidade, para tratar um câncer ErbB3/HER3 identificado por uma ou mais das mutações somáticas descritas neste documento. Em uma modalidade, o medicamento é para inibir uma atividade biológica do receptor HER3. Em uma modalidade, o anticorpo HER compreende um domínio de ligação a antígeno que especificamente liga a HER3, ou a HER3 e pelo menos um receptor HER adicional.

[00247] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona vários tipos diferentes de inibidores HER adequados para os métodos de tratamento. Em uma modalidade, o inibidor HER é selecionado do grupo consistindo em trastuzumabe - um anticorpo anti-ERBB2 que liga o domínio IV de ERBB2; pertuzumab - um anticorpo anti-ERBB2 que liga o domínio II de ERBB2 e evita dimerização; anti-ERBB3.1 - um anti-ERBB3 que bloqueia ligação de ligante (liga domínio III); anti-ERBB3.2 - um anticorpo anti-ERBB3 que liga domínio III e bloqueia li-

gação de ligante; MEHD7945A – um anticorpo ERBB3/EGFR dual que bloqueia ligação de ligante (liga domínio III de EGFR e ERBB3); cetuximabe – um anticorpo EGFR que bloqueia ligação de ligante (liga domínio III de EGFR); Lapatinibe – um inibidor de molécula pequena ERBB2/EGFR dual; e GDC-094148 – um inibidor PI3K.

[00248] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um agente terapêutico anticâncer para uso em um método para tratar um câncer ErbB3 em um indivíduo, o dito método compreendendo (i) detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo a presença ou ausência de uma mutação de aminoácido em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição da sequência de aminoácido de ErbB3 (como descrito neste documento), em que a presença da mutação é indicativa da presença de câncer no indivíduo do qual a amostra foi obtida; e (ii) se uma mutação for detectada na sequência de ácido nucleico, administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do agente terapêutico anticâncer.

Terapia de Combinação

[00249] É contemplado que terapias de combinação podem ser empregadas nos métodos. A terapia de combinação pode incluir, mas não se limita a, administração de dois ou mais agentes terapêuticos de câncer. A administração dos agentes terapêuticos em combinação tipicamente é realizada durante um período de tempo definido (geralmente minutos, horas, dias ou semanas dependendo da combinação selecionada). Terapia de combinação se destina a englobar a administração destes agentes terapêuticos de uma maneira sequencial, isto é, em que cada agente terapêutico é administrado em um tempo diferente, assim como a administração destes agentes terapêuticos, ou pelo menos dois dos agentes terapêuticos, de uma maneira substancialmente simultânea.

[00250] O agente terapêutico pode ser administrado pelas mesmas ou diferentes rotas de administração. Por exemplo, um antagonista ErbB na combinação pode ser administrado por injeção intravenosa enquanto um agente quimioterapêutico na combinação pode ser administrado oralmente. Alternativamente, por exemplo, ambos os agentes terapêuticos podem ser administrados oralmente, ou ambos os agentes terapêuticos podem ser administrados por injeção intravenosa, dependendo dos agentes terapêuticos específicos. A sequência na qual os agentes terapêuticos são administrados também varia dependendo dos agentes específicos.

[00251] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para tratar um indivíduo tendo um câncer HER3/ErbB3 identificado por uma ou mais mutações somáticas descritas neste documento, em que o método de tratamento compreende administrar mais de um inibidor ErbB. Em uma modalidade, o método compreende administrar um inibidor ErbB3, por exemplo, um antagonista ErbB3, e pelo menos um inibidor ErbB adicional, por exemplo, um antagonista EGFR, um ErbB2, ou um ErbB4. Em outra modalidade, o método compreende administrar um antagonista ErbB3 e um antagonista EGFR. Em outra modalidade, o método compreende administrar um antagonista ErbB3 e um antagonista ErbB2. Em ainda outra modalidade, o método compreende administrar um antagonista ErbB3 e um antagonista ErbB4. Em algumas modalidades, pelo menos um dos antagonistas ErbB é um anticorpo. Em outra modalidade, cada um dos antagonistas ErbB é um anticorpo.

Kits

[00252] Para uso nas aplicações descritas ou sugeridas neste documento, kits ou artigos de fabricação também são fornecidos. Esses kits podem compreender um meio transportador sendo compartimentalizado para receber em íntimo confinamento um ou mais meios

de recipiente, tal como frascos, tubos e similares, cada um dos meios de recipiente compreendendo um dos elementos separados a sere usado no método. Por exemplo, um dos meios de recipiente pode compreender uma sonda que é ou pode ser marcada detectavelmente. Essa sonda pode ser um polinucleotídeo específico para um polinucleotídeo compreendendo uma mutação somática ErbB3 associada com câncer como divulgado aqui. Quando o kit utiliza hibridização de ácido nucleico para detectar um ácido nucleico alvo, o kit também pode ter recipientes contendo nucleotídeo(s) para amplificação da sequência de ácido nucleico alvo e/ou um recipiente compreendendo um meio repórter, tal como uma proteína de ligação a biotina, tal como avidina ou estreptavidina, ligada a uma molécula repórter, tal como um marcador enzimático, fluorescente ou radioisótopo. Em uma modalidade, os kits da presente invenção compreendem um ou mais agentes de detecção de câncer ErbB3 como descrito neste documento. Em uma modalidade preferida, o kit compreende um ou mais agentes de detecção de câncer gastrointestinal ErbB3, ou um ou mais agentes de detecção de câncer de pulmão ErbB3, como descrito neste documento. Em outra modalidade, o kit ainda compreende um agente terapêutico (por exemplo, um inibidor ErbB3), como descrito neste documento.

[00253] Em outras modalidades, o kit pode compreender um agente marcado capaz de detectar um polipeptídeo compreendendo uma mutação somática ErbB3 associada com câncer, como divulgado neste documento. Esse agente pode ser um anticorpo o qual liga o polipeptídeo. Esse agente pode ser um peptídeo o qual liga o peptídeo. O kit pode compreender, por exemplo, um primeiro anticorpo (por exemplo, fixado a um suporte sólido) o qual liga a um polipeptídeo compreendendo uma variante genética como divulgado neste documento; e, opcionalmente, um segundo anticorpo diferente o qual liga ou ao polipeptídeo ou ao primeiro anticorpo e é conjugado a um marcador detectá-

vel.

[00254] Kits tipicamente compreenderão o recipiente descrito acima e um ou mais recipientes compreendendo materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário final, incluindo tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e/ou inserções de embalagem com instruções para uso. Um marcador pode estar presente no recipiente para indicar que a composição é usada para uma terapia específica ou aplicação não terapêutica e também pode indicar orientações para cada uso in vivo ou in vitro use, tal como aquelas descritas acima. Outros componentes opcionais no kit incluem um ou mais tampões (por exemplo, tampão de bloqueio, tampão de substrato, etc.), outros reagentes, tal como substrato (por exemplo, cromógeno) os quais são quimicamente alterados por um marcador enzimático, solução de recuperação de epítipo, amostras de controle (controles positivos e/ou negativos), lâmina(s) de controle, etc.

[00255] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona o uso de agente de detecção de câncer ErbB3 na fabricação de um kit para detectar câncer em um indivíduo. Em uma modalidade, a detecção de um câncer ErbB3 compreende detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo a presença ou ausência de uma mutação de aminoácido em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição da sequência de aminoácido ErbB3 (como descrito neste documento), em que a presença da mutação é indicativa da presença de câncer no indivíduo do qual a amostra foi obtida.

Métodos de Marketing

[00256] A invenção neste documento também engloba um método para marketing dos métodos divulgados de diagnóstico ou prognóstico de câncer compreendendo anunciar, instruir e/ou especificar para uma audiência alvo o uso dos métodos divulgados.

[00257] Marketing é geralmente comunicação paga por meio de um meio não pessoal no qual o patrocinador é identificado e a mensagem é controlada. Marketing para os fins deste documento inclui publicidade, relações públicas, colocação de produto, patrocínio, avaliação e similares. Este termo também inclui avisos públicos de informação patrocinados aparecendo em qualquer um dos meios de comunicação impressos.

[00258] O marketing do método de diagnóstico neste documento pode ser realizado por qualquer meio. Exemplos de meios de marketing usados para distribuir estas mensagens incluem televisão, rádio, filmes, revistas, jornais, a internet e quadros de aviso, incluindo comerciais os quais são mensagens aparecendo na mídia de radiotransmissão.

[00259] O tipo de marketing usado dependerá de muitos fatores, por exemplo, da natureza da audiência alvo a ser atingida, por exemplo, hospitais, companhias de seguro, clínicas, médicos, enfermeiros e pacientes, assim como de considerações de custo e das leis e dos regulamentos jurisdicionais relevantes governando o marketing de medicamentos e diagnósticos. O marketing pode ser individualizado ou customizado com base em caracterizações de usuário definidas por interação de serviço e/ou outros dados, tal como localização demográfica e geográfica do usuário.

[00260] Os exemplos a seguir são oferecidos para fins ilustrativos apenas e não se destinam a limitar o escopo da invenção de qualquer maneira.

[00261] Todas as patentes e referências de literatura citadas no presente relatório descritivo são incorporadas neste documento por referência em sua totalidade.

EXEMPLOS

Exemplo - Mutações ERBB3 oncogênicas em cânceres humanos

[00262] Dada a importância de ERBB3 em cânceres humanos, nós

sistematicamente investigamos cânceres humanos e identificamos mutações somáticas recorrentes e também mostram que estas mutações são transformantes. Além disso, nós avaliamos terapêuticos direcionados em modelos animais de câncer conduzidos por mutante ERBB3 e mostram que uma maioria deles é eficaz em bloquear oncogênese conduzida por mutante ERBB3.

Materiais e métodos

DNA de tumor, mutação e amplificação genômica

[00263] Amostras de tumor humano primário apropriadamente consentidas foram obtidas de fontes comerciais (Figura 1). As amostras de tecido humano usadas no estudo foram desidentificadas (duplamente codificadas) antes de seu uso e daí o estudo usando estas amostras não é considerado pesquisa de indivíduo humano de acordo com os regulamentos e diretriz relativa do US Department of Human and Health Services (45 CFR Part 46). O teor de tumor em todos os tumores usados foi confirmado ser >70% por revisão de patologia. DNA de tumor foi extraído usando kit fácil Qiagen Tissue. (Qiagen, CA). Todos os éxons de codificação de *ERBB3* foram amplificados usando iniciadores listados na Tabela 1 abaixo (Applied Biosystems, CA). Os produtos PCR foram gerados usando dois pares de iniciadores, um par externo e um par interno para aumentar a especificidade (Tabela 1), usando condições de PCR padrão foram sequenciados usando sequenciador 3730xl ABI. Os dados de sequenciamento foram analisados para presença de variantes não presentes na base de dados dbSNP usando Mutation Surveyor (Softgenetics, PA) e programas de alinhamento de sequência automatizados adicionais. As variantes putativas identificadas foram confirmadas por sequenciamento de DNA ou análise de espectrometria de massa (Sequenom, CA) do DNA do tumor original seguidos por confirmação de sua ausência no DNA normal combinado adjacente por um processo similar aplicado ao DNA do tumor. Se-

quências de ácido nucleico e aminoácido ERBB3 normais são fornecidas nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1 - Iniciadores usados para PCR e sequenciamento

ERBB3	Target_ID	Iniciador externo 5p	Iniciador externo 3p	Iniciador Interno 5p (F)	Iniciador interno 3p (F)	Iniciadores de sequenciamento
1	DNA519201	TGGCTGCTGCTATCC	CCGAGGCTGAGC	GGGCGCGGTGACT	AATGGCGGCTCG	F & R
2	DNA519202	GGCACTACAGCTTC	TCCAGTGAAGCC	AGAGAGAGAAAGCTCTC	TACAACGTGAGACCATAG	F & R
3	DNA519203	GGGTAACTCCGTCTCA	GGCCCTCTATTGCTTAG	AGATCCAGCTATTGTACTC	TAGTCCCGCTACTG	F & R
4	DNA519204	CTCTCATCTTATAAGGG	TGGTTAGATTCCAGGAGA	CTGGACAGTGACTGA	CTGCTCTTTTCTTGAACA	F & R
5	DNA519205	CGCCCTTTGTTGACA	CACCTGAGGAGCACAGAT	CTGGGTTGGGACTAG	GGCCCAAGCAGTGA	F & R
6	DNA519206	ATCAGAGACTGCCAGA	TGTGGACAGCGAGGT	TTGCAAGGGGGGATG	AGCTGGAAAGTTAGCTTG	F & R
7	DNA519207	CCAGTGTGCTGCTGAT	GGAGGACTGGAGCTGA	TGTGCTCTCTCACTGTAA	GGTGATAGCTGAAGTCAT	F & R
8	DNA519208	CAATAGTGAAGAGCTTTGAT	ATCTTGGTGCAGTTTCAAA	CTTACTTCTGCTCTTGTA	AAGTCCAGGTTGGCC	F & R
9	DNA519209	CTGTCTCTGACACGA	ATGGAGGATGTTTANGCA	GATCAACATCTGTGTC	GATGTCTCTGAGGGA	F & R
10	DNA519210	CTTGTTCACAGATGCT	GACTGGATGTTGAGTA	CCCTTAATCTTTGAGTCTTG	ACACTGAAGTTGTGATGT	F & R
11	DNA519211	TCAAGGTGAGTGGC	GATCCACTGAGAGGG	GTCTTCGGCAGATAC	GAAATTTTCTCAGTGGCTAGT	F & R
12	DNA519212	CTCAAAACCAAGGGTTT	AGGACTCCCAAG	CACCTGTCTATACAGCA	GGAGAGGAGTCTGAG	F & R
13	DNA519213	AGGCTCTGCTAGGTG	CCAAGTCTGACCTTC	CAGAGACTGGGTGA	TCCCTGTAGTGGGA	F & R
14	DNA519214	CAGTCAAGGATGGGTG	TCCCAAGGTCAATTCATA	CTTCTGAATGGGTACAGTA	GTCAAGAGATCAGATC	F & R
15	DNA519215	TGGAGCATCTGGGGA	CACCAAGCTCGGC	GATCTCCAAAGGGAGAC	TCTCGAAGTCCGAC	F & R
16	DNA519216	TCAAGGAGTTTCCAGAA	CAGCTTTAGACTACTGAAAG	GAACTCTGGAATTAACCTCA	GACCAACTAAATCTGG	F & R
17	DNA517682	CTTTCAAGTCTTAAGACTG	ACCAGCTACTTCTTGA	GCTTCTGGACTTCCC	CCAGTGTCTCTTAGGG	F & R
18	DNA517683	CAGGCTGTGACCTC	TGCAGCTGGATCTTGAT	GGCAATAACTTCTCAGTT	CGGTCCACTCTTGTG	F & R
19	DNA517684	GAAGCTTAAAGTCTTTGG	GAACCAACAGGTTTCA	CTTCAAGAGACAGAGCTAA	TAAGAGACAAAGGATTATCT	F & R
20	DNA517685	GGAGAGAGCAATATTAG	CGCTCAATGCTGTG	AAGGAAATCTGTATGCCG	CTTCACTGGCTTGGC	F & R
21	DNA517686	CCAAACCAACCTC	CAAGTCCCAAGTCTTG	AAGGATCTAGTTGTGC	GGGTGAGCCACCG	F & R
22	DNA517687	AGGCGAGACTCCGT	CTGTACAGCTGTTGC	CACCTGCACTCCAGTCT	CGGAAGGTCACTCACTC	F, R & R1
23	DNA517688	GATGCCCTCTCTACC	CAAGCTGGGTGACAA	CTGGAGCTATGGTCAAT	CCAGATTTGATTGACG	F, F1 & R
24	DNA517689	AGATGGGTTTCACTATGT	CTCTCTCTCTCTAGCTT	AGATAGCTGGGACTTTAG	GTCTAGGTCTAGTTCTG	F & R
25	DNA519217	GCCCAACCTTTAAGAAC	TGATGGACTTAAAGGCTC	GTTTGGATGATTTGATGAAAC	AGATTACCTGGTTGATG	F & R
26	DNA519218	GCCTACAGTTGGAC	CCTCAGTGATCCACT	CAACACCACTGG	ATTACAGGTGTGCACCA	F & R
27a	DNA519219_1	GGCAGTGAACACCCA	ATAACGGTTGACATCTTC	GGCAACAGACAGAGCT	GTGTGTATCTGGCATGA	F, R & R2
27b	DNA519219_2	CGTCCAGTCTCTCTACA	GAGGAGGAGTACCT	TGGGACAGTGAAGC	CAGAACTGAGACCCA	F & R
28a	DNA519220_1	CTCAAGGTGCTGAC	CCCTGAAAGCTCTC	CATGGCAGATACACC	GGCGGCATATGGA	F & R
28b	DNA519220_2	CTTGAGGAGCTGGGTT	GTCAAAATGTTTAAAGCTCC	ATCCGCTAGGCCAA	TACATACCAATGAATTTGTGTC	F & R

F1 = TCACTGGCCCGCAGTT; R1 = GGAGGAGAGATGGACT; R2 = CTCTTCTCTTAACCCG

[00266] Tabela 1 divulga as sequências "5p Iniciador Externo" como SEQ ID NOS 3-32, as sequências "3p Iniciador Externo" como SEQ ID NOS 33-62, as sequências "5p Iniciador Interno" como SEQ ID NOS 63-92, as sequências "3p Iniciador Interno" como SEQ ID NOS 93-122, e as sequências "F1," "R1" e "R2" como SEQ ID NOS 123-125, todas respectivamente, em ordem de aparição.

Linhagens Celulares

[00267] A linhagem de célula pró-B de camundongo dependente de IL-3- BaF3 e MCF10A, uma célula epitelial de mamífero, foi adquirida de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Células BaF3 foram mantidas em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (Thermo Fisher Scientific, IL), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicillina, 100 mg/ml de estreptomicina (completa RPMI) e 2 ng/mL de IL-3 de camundongo. Células MCF10A foram mantidas em DMEM: F12 suplementado com 5% (v/v) de soro de cavalo, 0,5 µg/ml de hidro cortisona, 100 ng/ml de toxina de cólera, 10 µg/ml de insulina, 20 ng/ml de EGF, L-glutamine 2 mM, 100 U/ml de penicillina e 100 mg/ml de estreptomicina.

Plasmídeos e anticorpos

[00268] Um vetor retroviral, pRetro-IRES-GFP (Jaiswal, B. S. *et al. Cancer Cell* **16**, 463-474 (2009)), foi usado para expressar estavelmente ERBB3 tipo selvagem e mutantes marcados FLAG c-terminal. Mutantes ERBB3 usados no estudo foram gerados usando Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, CA). Constructos retrovirais que expressam ERBB2 de comprimento total com uma sequência sinal herpes simplex de marcador de glicoproteína D (gD) N-terminal ou EGFR fundido a sequência de codificação gD após remover a sequência sinal de secreção nativa, como feito com ERBB2 anteriormente, foram expressados usando vetor retroviral pLPCX (Clontech, CA) (Schaefter et al. *J Biol Chem* **274**, 859-866 (1999)).

[00269] Anticorpos que reconhecem pERBB3 (Y1289), pEGFR (Y1068), pERBB2 (T1221/2), pAKT (Ser473), pMAPK, MAPK total e AKT (Cell Signaling Technology, MA), gD (Genentech Inc., CA), β -ACTIN e FLAG M2 (Sigma Life Science, MO) e anticorpos secundários conjugados a HRP (Pierce Biotechnology, IL) para western blots foram usados no estudo.

Geração de linhagens de células estáveis

[00270] Constructos retrovirais codificando ERBB3-FLAG tipo selvagem ou mutantes e gD-EGFR ou gD ERBB2 foram transfectados em células anfóteras Pheonix usando Eugene 6 (Roche, Basal). O vírus resultante foi, então, transduzido para cada uma das células BaF3 ou MCF10A. Os 10% de topo de cada uma das células infectadas por retrovírus mutante de vetor vazio, tipo selvagem ou ERBB3 com base na expressão de GFP conduzida por IRES retroviral foram separados esteis por citometria de fluxo e caracterizados por expressão de proteínas por western blot. Para gerar linhagens estáveis expressando mutantes ERBB3 junto com EGFR ou ERBB2, células expressando ERBB3 tipo selvagem ou mutantes separados de FACS foram infectadas com cada um de vírus EGFR ou ERBB2. Células infectadas foram, então, selecionadas com 1 μ g/ml de puomicina por 7 dias. Grupos destas células foram, então, usados em estudos adicionais.

Ensaio de sobrevivência e proliferação

[00271] Células BaF3 estavelmente expressando o ERBB3 tipo selvagem e mutante sozinhos ou juntos com EGFR ou ERBB2 foram lavadas duas vezes em PBS e plaqueadas em 3 placas de 96-poços em cópias de oito em meio RPMI completo sem IL3. Como necessário células foram, então, tratadas com concentração diferente de anticorpo NRG1 e anti-NRG1 ou anticorpos ERBB diferentes, tirosina cinase ou inibidores de molécula pequena PI3K para testar seus efeitos na sobrevivência ou proliferação de célula, onde relevante como represen-

tado nas figuras. Células viáveis em 0 h e 120 h foram determinadas usando kit de viabilidade celular de luminescência Cell Titer-Glo (Promega Corp., WI) e leitor de placa de luminescência Synergy 2 (Biotek Instrument, CA). Todos os valores de números de células foram normalizados contra valores 0h. A fim de avaliar a proliferação de MCF10A, ERBB3-WT expressando estavelmente ou mutantes foram lavados duas vezes em PBS e 5000 células plaqueadas em placas de 96-poços em cópias de oito em meios isentos de soro triplicatas e deixadas proliferar por 5 dias. Os números de células foram medidos no dia 0 e dia 5 usando o kit de viabilidade celular de luminescência. Os dados apresentados mostram SEM \pm média de sobrevivência no dia 5 em relação ao dia 0. Média e significância estatística foram determinadas usando GraphPad V software (GraphPad, CA).

Imunoprecipitação e western blot

[00272] Para avaliar o nível de complexo de receptor ERBB3-ERBB2 heterodimérico expresso na superfície da célula, nós reticulamos as proteínas de superfície celular usando reticuladores impermeáveis a membrana bis (sulfosuccinimidil) suberato (BS3) (Thermo scientific, IL), antes da imunoprecipitação. Células BaF3 ou com ou sem tratamento de ligante (NRG1) foram lavadas duas vezes em 50mM HEPES, pH 7,5 frio e 150mM NaCl foram tratados com 1mM BS3 em tampão HEPES por 60 min. a 4°C. A reticulação foi paralisada lavando as células duas vezes com 50mM Tris-Cl e 150mM NaCl, pH 7,5. As células foram, então, lisadas em tampão de lise I (50mM TrisHCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100). Para imunoprecipitação, os lisados clarificados foram incubados durante a noite a 4°C com contas acopladas a anticorpo anti-FLAG-M2 (Sigma, MO). As contas FLAG foram lavadas três vezes usando o tampão de lise I. As proteínas imunoprecipitadas remanescentes nas contas foram fervidas em tampão de carregamento SDS-PAGE, resolvidas em uma SDS-PAGE

4-12% (Invitrogen, CA) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Proteínas imunoprecipitadas ou proteínas de lisados foram detectadas usando anticorpo primário apropriado, secundário conjugado a HRP e substrato de detecção de quimioluminescência Super signal West Dura de quimioluminescências (Thermo Fisher Scientific, IL).

[00273] Para estudos western blot células MCF10A foram privadas de soro e crescidas na ausência de EGF ou NRG1. Similarmente, o estado de receptores ERBB e componentes de sinalização a jusante foi avaliado em células BaF3 crescidas na ausência de IL-3.

Ensaio de ligação de proximidade

[00274] Linhagens de células BaF3 estavelmente expressando tipo selvagem ou mutantes ERBB3 P262H, G284R e Q809R junto com ERBB2 foram crescidas até subconfluência. As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas durante a noite em meio RPMI isento de IL3-free. Preparações de citospina destas células foram feitas, secas ao ar e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min. e, então, permeabilizadas com Triton 0,05% em PBS por 10 min. Após bloquear por 60 min. com solução de bloqueio Duolink (Soderberg *et al. Nat Methods* **3**, 995-1000 (2006)), as células foram ou incubadas com anticorpos anti-FLAG (coleho) e anti-gD (camundongo) ou anti-ERBB3 (camundongo) (Labvision, CA) e anti-ERBB2 (coleho) (Dako, Denmark) por 1 hora à temperatura ambiente. Coloração Duolink foi realizada usando sondas PLA Duolink antioelho mais e anticamundongo menos e reagentes de detecção Duolink II (Uppsala, Sweden) vermelho distante seguindo protocolos do fabricante (Soderberg *et al. Nat Methods* **3**, 995-1000 (2006)). A aquisição de imagem foi feita usando Axio-plan2, microscópio Zeiss e filtro apropriado para DAPI e Texas red em objetiva 63X. Para medição quantitativa de sinal, arquivos de imagem tiff foram analisados com software de ferramenta de imagem Duolink após aplicar limiar definido pelo usuário.

Ensaio de formação de colônia

[00275] Células BaF3 estavelmente expressando EGFR (2×10^5) ou ERBB2 (50,000) junto com ERBB3 tipo selvagem ou mutantes, foram misturadas com 2 ml de Metilcelulose isenta de IL3 (STEMCELL Technologies, Canada) e plaqueadas em placas de 6 poços e quando indicado, as células foram tratadas com diferentes anticorpos ERBB ou tirosina cinase ou inibidores de molécula pequena PI3K antes do plaqueamento. As placas foram, então, incubadas a 37°C por 2 semanas. Para formação de colônica MCF10A, 20.000 células MCF10A estavelmente expressando ERBB3-WT ou mutantes sozinhos ou em combinação com EGFR ou ERBB2 foram misturadas com ágar 0,35% em DMEM: F12 carecendo de soro, EGF e NRG1 e plaqueadas em ágar de base 0,5%. As placas foram, então, incubadas a 37°C por 3 semanas. A presença de colônicas foi avaliada usando imageador de contagem Gel (Oxford Optronix Ltd, UK). O número de colônia em cada placa foi quantificado usando software de contagem Gel (Oxford Optronix Ltd, UK).

Morfogênese tridimensional ou ensaio de formação de acini

[00276] Células MCF10A estavelmente expressando ERBB3 tipo selvagem ou mutantes ou sozinhos ou em combinação de cada um de EGFR ou ERBB2 foram semeadas em Matrigel (BD Biosciences, CA) reduzido de fator de crescimento em lâminas de câmara de 8- poços seguindo o protocolo descrito anteriormente (Debnath *et al. Methods* **30**, 256-268 (2003)). A morfogênese de acini foi fotografada no dia 12-15 usando microscópio zeiss usando objetiva de 10x.

[00277] A extração, fixação e imunocoloração completas de culturas 3D do dia 13 foram realizadas como descrito anteriormente (Lee *et al. Nat Methods* **4**, 359-365 (2007)). Resumidamente, após extração, a acini foi fixada com metanol-acetona (1;1) e corada com integrina anti- $\alpha 6$ de rato (Millipore, Billerica MA), anti Ki67 de coelho (Vector Labs, Burlingame, CA) e DAPI. Anticorpos secundários Alexa Fluor 647 anti-

rato de cabra (Invitrogen, CA) e Alexa Fluor 532 antioelho de cabra (Invitrogen, CA) foram usados no estudo. Imageamento confocal foi realizado com uma objetiva de imersão em óleo de 40x, usando um microscópio confocal Leica SPE.

Estudo de migração transpoço

[00278] Células MCF-10A estavelmente expressando vetor vazio, ERBB3 tipo selvagem ou vários mutantes de ERBB3 (50.000 células) foram semeadas em câmaras de migração transpoço de 8µm (Corning, #3422). As células foram deixadas migrar por 20 h em meio de ensaio isento de soro. Células na parte superior da membrana foram raspadas usando um cotonete de algodão e as células migradas foram fixadas em paraformaldeído 3,7 % (v/v) e coradas com Crystal Violet 0,1 %. De cada transpoço, imagens foram tiradas de cinco campos diferentes sob um microscópio de contraste de fase a ampliação de 20X e o número de células migradas foi contado. Os números obtidos também foram verificados corando os núcleos por corante Hoechst. O aumento em vezes na migração observado em células expressando ERBB3 mutante em comparação com as células expressando ERBB3 tipo selvagem foi calculado e teste t Student foi realizado para testar para a significância com software prism pad.

Estudos em Animal

[00279] Células BaF3 (2×10^6) expressando o ERBB3 tipo selvagem ou mutantes junto com ERBB2 foram implantadas em camundongos nus Balb/C de 8-12 semanas de idade por injeção na veia da cauda. Para estudo de eficácia de anticorpo *in vivo*, camundongos foram tratados com 40 mg/kg QW de anti-Ragweed (controle), 10mg/kg QW de trastuzumabe, 50mg/kg de QW anti-ERBB3.1 e 100mg/kg de QW anti-ERBB3.2 começando no dia 4 após implante de célula. Um total de 13 animais por tratamento foi injetado. Destes 10 camundongos foram acompanhados para sobrevivência e 3 foram usados para ne-

cropsia no dia 20 para avaliar progressão da doença por análise histológica de medula óssea, baço e fígado. Suspensão de célula única de medula óssea e baço obtida destes animais também foi analisada para a presença e proporção de células BaF3 GFP positivas por análise FACS. Quando os possíveis animais mortos ou moribundos no estudo de sobrevivência foram dissecados para confirmar a causa da morte. Análises morfológicas e histológicas de baço, fígado e medula óssea também foram feitas nestes animais. Medula óssea, baço e fígado foram fixados em formalina tamponada neutra a 10%, então, processados em um processador de tecido automatizado (TissueTek, CA) e embebidos em parafina. Seções de quatro microns de espessura foram coradas com H&E (Sigma, MO), e analisadas histologicamente para a presença de células de tumor infiltrantes. Fotografias de histologia foram tiradas em um microscópio composto Nikon 80i com uma câmera Nikon DS-R. Todos os estudos de animal foram realizados de acordo com os protocolos aprovados do Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) da Genentech.

Análises Estatísticas

[00280] Barras de erro onde apresentadas representam média \pm SEM. Teste t de Student (duas caudas) foi usado para análises estatísticas para comparar grupos de tratamento usando GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Um valor $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$). Para o Método de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier estatísticas de logarítmicas foram usadas para testar para diferença em sobrevivência.

Resultados:

Identificação de mutações de ERBB3

[00281] Na realização de sequenciamento de exoma total de setenta tumores de cólon primários junto com suas amostras normais com-

binadas, nós identificamos mutações somática em *ERBB3* (Seshagiri, S. *et al.* Análise abrangente de genomas de câncer de cólon identifica mutações recorrentes e fusões R-espondina. (*Manuscrito em Preparação* 2011)). Para compreender ainda mais a prevalência de mutação *ERBB3* em tumores sólidos humanos nós sequenciamos éxons de *ERBB3* em um total de 512 amostras de tumor primário humano consistindo em 102 de câncer (70 amostras de triagem de exomo total (Seshagiri, S. *et al.* Comprehensive analysis of colon cancer genomes identifies recurrent mutations and R-spondin fusions. (*Manuscrito em Preparação* 2011)) e 32 amostras de cólon adicionais) colorretal, 92 de gástrico, 74 de adenocarcinoma (adeno) de pulmão de célula não pequena (NSCLC) , 67 de NSCLC (Carcinoma escamoso), 45 de carcinoma renal, 37 de melanoma, 32 de ovariano, 16 de célula grande de pulmão, 15 de esofágico, 12 de câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), 11 de hepatocelular (HCC) e 9 de outros cânceres [4 de câncer de pulmão (outro), 2 de cecal, 1 de pulmão (neuroendócrino), 1 pancreático e 1 câncer retal] (Figura 1). Nós encontramos proteína alterando mutações de *ERBB3* em 12% de câncer gástrico (11/92), 11% de cólon (11/102), 1% de NSCLC (adeno; 1/74) e 1% de NSCLC (escamoso; 1/67) (Figura 4). Embora estudos anteriores reportem proteína esporádica alterando mutações *ERBB3* em câncer NSCLC (escamoso; 0,5% [3/188]), glioblastoma (1% [1/91]), câncer de mama hormônio positivo (5% [3/65]), cólon (1% [1/100]), ovariano (1% [3/339]), e de cabeça e pescoço (1% [1/74]), nenhum reportou mutações recorrentes nem avaliou a relevância funcional destas mutações em câncer (Figura 4 e Tabelas 2 e 3). Nós confirmamos que todas as mutações reportadas neste estudo são somáticas testando para sua presença no DNA de tumor original e ausência no tecido normal adjacente combinado por meio de sequenciamento adicional e/ou análise de espectrometria de massa. Além das mutações missense, nós também en-

contramos três mutações sinônimas (não alterando proteína) , cada uma em cânceres de cólon, gástricos e ovarianos. Além disso, em tumores de cólon usando dados RNA-seq (Seshagiri, S. *et al.* Comprehensive analysis of colon cancer genomes identifies recurrent mutations and R-spondin fusions. (*Manuscrito em Preparação* 2011)), nós confirmamos a expressão dos mutantes ERBB3 e a expressão de ERBB2 nestas amostras (Figura 5).

[00282] Uma maioria das mutações agrupou principalmente na região ECD, embora algumas mapeassem para o domínio cinase e a cauda intracelular de ERBB3. De modo interessante, entre os mutantes ECD estavam quatro posições, V104, A232, P262 e G284, que continham substituições recorrentes através de múltiplas amostras, indicando que esas são hotspots mutacionais. Duas das quatro posições hotspots ECD identificadas em nossa análise, V104 e G284, foram anteriormente reportadas mutadas em uma amostra ovariana e uma de pulmão (adenocarcinoma) respectivamente (Greenman *et al.* *Nature* **446**, 153-158 (2007); Ding *et al.* *Nature* **455**, 1069-1075 (2008)). Além disso, a maioria das substituições missense recorrentes em cada uma das posições hotspot resultou na mesma mudança de aminoácido indicativa de um papel condutor potencial para estas mutações. Nós também identificamos uma mutação hotspot, S846I, no domínio cinase quando nós combinamos nossos dados com uma única mutação ERBB3 previamente publicada em câncer de cólon (Jeong *et al.* *International Journal of Cancer* **119**, 2986-2987 (2006)).

[00283] É interessante notar que uma maioria dos resíduos mutados identificados foram conservados através de ortólogos ERBB3 (mostrados na Figura 6, assim como a sequência *C. lupus* (XP_538226.2) de SEQ ID NO:) e alguns dos resíduos foram conservados entre membros da família ERBB, o que sugere ainda que estas mutações provavelmente têm um efeito funcional.

Tabela 2 – Mutações somáticas ERBB3

ENTREZ GENE_ID	HUGO_GENE SYMBOL	MUT_TYPE	MUT_EFFECT	MUT_LOCATION	CROMOSSOMO FITA	ID	GENOME_NT		REFSEQ	TRANSCRIPT_ID	NT_CHGGE	AA_CHGGE	PROTEIN_DOMAIN	COSMIC SAMPLE		
							POSITION FROM*	POSITION TO*						IDS	ID	DISEASE_CATEGORY
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56477631	56477631	NM_001982.2	372T>A	60M>K	Recep_L_domain PF01030.15		96391		
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56478854	56478854	NM_001982.2	503G>T	104V>L	Recep_L_domain PF01030.15		86336		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56478854	56478854	NM_001982.2	503G>A	104V>M	Recep_L_domain PF01030.15	20710	96445		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56478854	56478854	NM_001982.2	503G>A	104V>M	Recep_L_domain PF01030.15	20710	95735		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56481390	56481390	NM_001982.2	770C>T	193R>O	Furin-like PF00757.11		95735		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não senso	Codificação	12	+	56481660	56481660	NM_001982.2	888C>T	232A>V	Furin-like PF00757.11		94200		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56481856	56481856	NM_001982.2	977C>T	262P>S	Furin-like PF00757.11		96157		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56481857	56481857	NM_001982.2	978C>A	262P>H	Furin-like PF00757.11		101592		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56481922	56481922	NM_001982.2	1043G>A	284G>R	Furin-like PF00757.11		96115		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56481922	56481922	NM_001982.2	1043G>A	284G>R	Furin-like PF00757.11		94592		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56481922	56481922	NM_001982.2	1043G>A	284G>R	Furin-like PF00757.11		96562		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56482336	56482336	NM_001982.2	1077T>C	295V>A	Furin-like PF00757.11		96737		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56482425	56482425	NM_001982.2	1166G>A	325G>R	Furin-like PF00757.11		96115		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56482425	56482425	NM_001982.2	1166G>A	325G>R	Furin-like PF00757.11		96115		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56487150	56487150	NM_001982.2	1489C>T	432I>I	Recep_L_domain PF01030.15		98204		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56487328	56487328	NM_001982.2	1667G>C	492D>H	Toxin_7 PF05980.3		100695		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Sinônimo	Codificação	12	+	56487675	56487675	NM_001982.2	1801G>A	536L>L			90574		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56490371	56490371	NM_001982.2	2333G>A	714V>M	Pkinase PF00069.16,Pkinase_Tyr PF07714.8		86582		Câncer Pulmão Células Não Pequenas
2065	ERBB3	Substituição	Sinônimo	Codificação	12	+	56490980	56490980	NM_001982.2	2619A>G	809Q>R	Pkinase_Tyr PF07714.8,Pkinase PF00069.16		101592		Câncer Ovariano
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56491645	56491645	NM_001982.2	2730G>T	846S>I	Pkinase PF00069.16,Pkinase_Tyr PF07714.8		101765		Câncer Pulmão Células Não Pequenas
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56495133	56495133	NM_001982.2	3683A>G	1164T>A			95504		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56495713	56495713	NM_001982.2	4096G>A	1301Q>Q			96630		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56478854	56478854	NM_001982.2	503G>A	104V>M			94120		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56478854	56478854	NM_001982.2	503G>A	104V>M			98988		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Sinônimo	Codificação	12	+	56478876	56478876	NM_001982.2	525A>G	111Y>C			94271		Câncer colorretal
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56478948	56478948	NM_001982.2	597G>T	135R>L			94138		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56481660	56481660	NM_001982.2	888C>T	232A>V			94128		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56486803	56486803	NM_001982.2	1410T>C	406M>T			94117		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56487212	56487212	NM_001982.2	1551G>A	453R>H			94255		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56487560	56487560	NM_001982.2	1686A>T	498K>I			94137		Câncer gástrico
2065	ERBB3	Substituição	Não sinônimo	Codificação	12	+	56494908	56494908	NM_001982.2	3458C>T	1089R>W			92177		Câncer gástrico

* Posições genômicas baseadas na versão NCBI R37
WES = sequenciamento de exoma completo

Tabela 3 – Mutações ERBB3 publicadas em cânceres humanos

Diagnóstico de tecido	# de mutantes	# de amostras	% frequência	Mutações (mudança de aminoácido)	Referência
1 Câncer de Mama (HR+)	3	65	4.62	Q281H, T389R, E928G	Nature (2010) 466: 869
2 NSCLC (Adeno)	3	188	1.60	G69R, G284R, Q298*	Nature (2008) 455: 1069
3 Glioblastoma	1	91	1.10	S1046N	Nature (2008) 455: 1061
4 Ovariano	3	339	0.88	V104M, V438I, D1149E	Nature (2007) 446: 153 [23 sampl (23 +316)
5 Cólon	1	100	1.00	S846I	Int J of Ca (2006) 119: 2986
6 Câncer de Cabeça e Pescoço	1	74	1.35	M90I	Science (2011) - Epub date 2011/07/30

[00284] Para ainda compreender as mutações nós as mapeamos para estruturas de cristal ERBB3 ECD⁷ publicado e domínio cinase (Jura *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 21608-21613 (2009); Shi *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 7692-7697 (2010)) (Figura 7 e Figura 8). De modo interessante, as mutações hotspot em V104, A232 e G284 agrupam na interface dos domínios I/II O agrupamento destes três sítios na interface entre os domínios II e III sugere que eles agem por um mecanismo comum. O domínio II compreende varios módulos ricos em cistina dispostos como vertebrados. A pequenas mudanças na relação entre estes aspectos semi-independentes foi atribuída importância funcional entre membros da família (Alvarado *et al. Nature* **461**, 287-291 (2009). As mutações V104/A232/G284 podem deslocar um ou mais destes módulos e provocar um fenótipo alterado. A mutação em P262 está na base do domínio II, perto de Q271 envolvida na interação domínio II/IV requerida para a confirmação amarrada fechada. Mutações de domínio cinase nos resíduos 809 e 846 são homólogas a posições proximais ao caminho tomado pela cauda C-terminal na estrutura de cinase de EGFR, um segmento ao qual foi atribuído um papel em endocitose. Sítios de outras mutações aparecem na Figura 8.

Mutantes ERBB3 promovem proliferação independente de ligante de células epiteliais mamárias MCF10A

[00285] Células epiteliais mamárias MCF-10A requerem EGF para proliferação (Soule, H. D. *et al. Cancer Res* **50**, 6075-6086 (1990); Petersen *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 9064-9068 (1992)). Oncogenes, quando expressados em células MCF10A, podem torná-las independentes de EGF (Debnath *et al. The Journal of cell biology* **163**, 315-326 (2003); Muthuswamy *et al. Nat Cell Biol* **3**, 785-792 (2001)). A fim de entender o potencial oncogênico das mutações ERBB3 nós testamos a capaci-

dade de um conjunto seletivo dos mutantes ERBB3 suportar transformação e proliferação celular. Nós testamos seis mutantes ERBB3 ECD (V104M, A232V, P262H, P262S, G284R e T389K) incluindo os quatro mutantes ECD-hotspot e dois mutantes de domínio cinase ERBB3 (V714M e Q809R) para seus efeitos na proliferação, sinalização, formação acinar, crescimento independente de ancoragem e migração de células expressando estavelmente os mesmos em células MCF10A. Uma vez que os membros da família ERBB funcionam como heterodímeros em sinalização e transformação celular, nós também testamos os efeitos funcionais de mutantes ERBB3 coexpressando os mesmos com EGFR ou ERBB2 tipo selvagem (WT). Concluímos que os mutantes ERBB3, quando expressados sozinhos em MCF10A, na ausência de ligante ERBB3 exógeno NRG1 ou EGF, mostraram muito pouco aumento na proliferação independente de ligante (Figura 9), formação de colônia (Figura 10) ou elevação nos marcadores de estado de ativação de sinalização como pERBB3, pAKT e pERK (Figura 11A) em comparação com ERBB3-WT. No entanto, a expressão de mutantes ERBB3 em combinação com EGFR ou ERBB2 mostrou um aumento significativo na proliferação e formação de colônia em comparação com ERBB3-WT (Figura 9 e Figura 10). Além disso, a maioria dos mutantes ERBB3 em combinação com EGFR ou ERBB2 levou a elevados pERBB3, pAKT e pERK (Figura 11B e C).

[00286] Células MCF10A formam esferoides de célula acinar quando cultivadas em culturas de gel de membrana de fundo tridimensional (3D) reconstituído na presença de EGF (Muthuswamy *et al. Nat Cell Biol* **3**, 785-792 (2001); Muthuswamy *Breast Cancer Research* **13**, 103 (2011)). No entanto, a expressão de alguns oncogenes pode as tornar independentes de EGF e também resulta em estruturas multiacinares complexas (Debnath *et al. The Journal of cell biology* **163**, 315-326 (2003); Brummer *et al. Journal of Biological Chemistry* **281**, 626-637

(2005); Bundy *et al. Molecular Cancer* 4, 43 (2005)). Em estudos de cultura 3D carecendo de soro, EGF e NRG1, a expressão ectópica de mutantes ERBB3 em combinação com EGFR ou ERBB2 em células MCF10A promoveu grandes estruturas acinares, em comparação com células MCF10A que coexpressam ERBB3-WT com EGFR ou ERBB2 (Figura 12A). A coloração para Ki67, um marcador para proliferação, em acini derivada de mutante ERBB3/ERBB2 coexpressando células MCF10 mostrou elevada proliferação em todos os mutantes testados (Figura 12B). Além disso, as mesmas células MCF10A expressando um subconjunto do mutante ERBB3/ERBB2 também mostraram elevada migração (Figura 12C e Figura 13A) em comparação com células ERBB3-WT/ERBB2. Estes resultados tomados juntos confirmam a natureza oncogênica dos mutantes ERBB3.

Mutantes ERBB3 promovem crescimento independente de ancoragem, de células epiteliais colônicas

[00287] IMCE são células epiteliais colônicas de camundongo imortalizadas que podem ser transformadas por expressão de Ras oncogênico (D'Abaco *et al.* (1996). *Mol Cell Biol* 16, 884-891; Whitehead *et al.* (1993). *PNAS* 90, 587-591). Nós utilizamos células IMCE e testamos mutantes ERBB3 para crescimento independente de ancoragem, sinalização e tumorigênese *in vivo* expressando estavelmente os mutantes ERBB3 ou sozinhos ou em combinação com ERBB2. Como mostrado na Figura 13B (a-b), nós concluímos que o ERBB3-WT ou os mutantes por si só, quando expressos, não promoviam crescimento independente de ancoragem. No entanto, uma maioria dos mutantes ERBB3, diferente do ERBB3-WT, quando coexpressos com ERBB2 promovia crescimento independente de ancoragem (Figura 13B (a-b)). Consistente com o crescimento independente de ancoragem observado, uma maioria das células IMCE expressando mutantes ERBB3 junto com ERBB2 mostrou elevados pERBB3 e/ou pERBB2 e um aumento

concomitante em pAKT e/ou pERK (Figura 13B (c-d)). Embora alguns dos mutantes ERBB3 por si só mostrassem elevados mutantes ERBB3, eles não promoviam crescimento independente de ancoragem ou sinalização a jusante. Para ainda confirmar que a atividade oncogênica dos mutantes ERBB3, nós testamos várias células expressando mutante ECD hotspot para sua capacidade de promover crescimento de tumor in vivo. Consistente com sua capacidade de suportar crescimento independente de ancoragem e sinalização, células IMCE coexpressando ERBB3 V104M, P262H ou G284R, diferente de WT, junto com ERBB2 promoviam crescimento de tumor (Figura 13B (e)).

Mutantes ERBB3 promovem sobrevivência e transformação independente de IL3

[00288] A fim de ainda confirmar a relevância oncogênica das mutações ERBB3 nós testamos os mutantes ERBB3 para seus efeitos em sinalização, sobrevivência de célula e crescimento independente de ancoragem expressando estavelmente os mesmos ou sozinhos ou em combinação com EGFR ou ERBB2 em células BaF3 dependentes de IL-3. BaF3 é uma linhagem de célula pró-B dependente de interleucina (IL)-3 que tem sido amplamente usada para estudar atividade oncogênica de genes e desenvolvimento de fármacos que têm como alvo condutores oncogênicos (Lee et al. (2006). PLoS medicine 3, e485; Warmuth et al. (2007) Current opinion in oncology 19, 55-60). Embora mutantes de ERBB3 promovessem pouca ou nenhuma sobrevivência independente de IL-3 de células BaF3 quando expressados sozinhos, eles eram bem mais eficazes do que WT-ERBB3, quando coexpressados em combinação com EGFR-WT ou ERBB2-WT (Figura 14 e Figura 15A,B). Mutantes ERBB3, coexpressados com ERBB2, foram ~10-50 vezes mais eficazes em promover sobrevivência independente de IL-3 do que quando coexpressados com EGFR (Figura 14). Isto é consistente com estudos anteriores que mostram que heterodímeros

ERBB3-ERBB2 formados em seguida a ativação estão entre os ativadores mais potentes de sinalização celular (Pinkas-Kramarski *et al. The EMBO journal* **15**, 2452-2467 (1996); Tzahar *et al. Molecular and cellular biology* **16**, 5276-5287 (1996); Holbro *et al. PNAS* **100**, 8933-8938 (2003)). De modo interessante, o mutante do domínio cinase Q809R em combinação com ERBB2 ou EGFR foi o mais eficaz na promoção de sobrevivência independente de IL-3 de células BaF3 do que qualquer um dos mutantes ECD testados. Consistente com a atividade de sobrevivência de célula independente de IL-3-observada, uma maioria dos mutantes ERBB3 mostrou fosforilação elevada, uma assinatura de receptores ERBB ativos quando expressa sozinha ou em combinação com ERBB2 ou EGFR (Figura 15A-C). Além disso, os mutantes ERBB3 coexpressados com ERBB2 mostraram elevado p-ERBB2 (Y1221/2) em comparação com o ERBB3-WT (Figura 15C). Além disso, em combinação com EGFR ou ERBB2, uma maioria das mutações ERBB3 mostrou elevados níveis de p-AKT e p-ERK, consistentes com sinalização a jusante constitutiva pelos mutantes ERBB3 (Figuras 15B, C). Tendo estabelecida a capacidade de os mutantes ERBB3 promoverem sobrevivência independente de IL3 de células BaF3, investigamos a seguir a capacidade destes mutantes para promover crescimento independente de ancoragem. Concluímos que as células BaF3 expressando estavelmente mutantes ERBB3 P262H, G284R e Q809R em combinação com ERBB2 promoveram crescimento independente de ancoragem robusto em comparação com ERBB3-WT (Figura 16). Although several of the mutants promoted some anchorage-independent growth when expressed with EGFR, the effect was not as pronounced as observed in combination with ERBB2. Isto é consistente com relatórios anteriores que estabelecem o requisito para ERBB3 em sinalização oncogênica mediada por ERBB2 (Holbro *et al. PNAS* **100**, 8933-8938 (2003); Lee-Hoeflich *et al. Cancer Research* **68**,

5878-5887 (2008)).

[00289] O sistema BaF3 foi usado para testar vários mutantes ERBB3 ECD (V104M, A232V, P262H, P262S, G284R e T389K) que incluíam seis mutantes hotspot ECD e quatro mutantes de domínio de cinase ERBB3 (V714M, Q809R, S846I e E928G) para seus efeitos em sobrevivência de célula, sianlização e crescimento independente de ancoragem independentes de IL-3 expressando estavelmente os mutantes ERBB3 ou sozinhos ou em combinação com ERBB2. ERBB3 é cinase impedida e em seguida a ligação de ligante ela preferencialmente forma heterodímeros com ERBB2 para promover sinalização (Holbro et al. (2003) *supra*; Karunagaran et al. (1996). The EMBO journal 15, 254-264; Lee-Hoeflich et al. (2008) *supra*; Sliwkowski et al. (1994) *supra*). Consistente com isto, na ausência de ligante exógeno, ERBB3 tipo selvagem (WT) e os mutantes ERBB3 por si só não promoviam sobrevivência independente de IL-3-de células BaF3 (Figura 37A). No entanto, na ausência de ligante ERBB3 exógeno, os mutantes ERBB3, diferente de ERBB3-WT, promoviam sobrevivência de célula BaF3 independente de IL3 quando coexpressados com ERBB2 (Figura 37A), indicando que os mutantes ERBB3 podem funcionar de um modo independente de ligante. A atividade de sobrevivência de célula de mutantes ERBB3 foi anulada quando eles eram coexpressados com um mutante ERBB2 K753M cinase morto (KD) , confirmando os requisito para um ERBB2 ativo em cinase (Figura 37A). Nós ainda investigamos mutantes ERBB3 para sua capacidade de promover crescimento independente de ancoragem. Os mutantes ERBB3, quando observados no ensaio de sobrevivência, por si só não suportavam crescimento independente de ancoragem (Figura 37B). No entanto, nós concluímos que uma maioria dos mutantes ERBB3 testados em combinação com ERBB2, promoviam crescimento independente de ancoragem quando comparados com células BaF3 expressando

ERBB3-WT/ERBB2 (Figura 37B-C). O crescimento independente de ancoragem promovido por ERBB3 foi confirmado dependente dessa atividade de cinase de ERBB2, quando os mutantes ERBB3 em combinação com ERBB2-KD não promoviam formação de colônia (Figura 37B-C). Análise Western blot das células BaF3 mostrou que a expressão de mutantes ERBB3 em combinação com ERBB2 levou a um aumento em pERBB3, pERBB2, pAKT e/ou pERK em comparação com ERBB3-WT (Figura 37D-F). Consistente com a falta de atividade de sobrevivência celular ou crescimento independente de ancoragem, os mutantes ERBB3 por si só ou em combinação com ERBB2-KD não mostravam elevados pERBB2 e/ou pAKT/pERK (Figura 37D-F), embora mutantes ERBB3 por si só mostrassem alguns níveis de pERBB3 elevados os quais provavelmente devidos a ERBB2 endógeno expressado por células BaF3. Em combinação com ERBB2, o mutante de domínio de cinase V714M ERBB3 consistente com sua fraca sinalização mostrou apenas uma modesta atividade de sobrevivência de célula e nenhum crescimento independente de ancoragem (Figura 37A-C). Em contraste, o mutante Q809R mais ativo em combinação com ERBB2 mostrou sinalização a jusante robusta em comparação com ERBB3-WT (Figura 37A-C).

Sinalização oncogênica independente de ligante por mutantes ERBB3

[00290] Em um esforço para compreender o mecanismo pelo qual os mutantes ERBB3 promovem sinalização oncogênica, nós testamos a dependência dos mutantes ERBB3 usando nosso sistema BaF3.

[00291] Para estabelecer a sinalização independente de ligante pelos mutantes ERBB3 nós testamos sua capacidade de promover sobrevivência de BaF3 independente de IL-3-em dose crescente de anticorpo anti-NRG1, um anticorpo neutralizante de ligante ERBB. Nós concluímos que a adição de um anticorpo neutralizante NRG1 (Hegde

et al. Manuscrito apresentado (2011) não tinha efeito adverso na capacidade dos mutantes ERBB3 promoverem sobrevivência ou formação de colônia independente de ancoragem independente de IL-3 (Figura 17). Consistente com isto, na imunoprecipitação realizada em seguida à reticulação de receptor de superfície de célula, nós encontramos evidência para elevados níveis de heterodímeros mutante ERBB3/ERBB2, na ausência de ligante, em comparação com as células BaF3 coexpressando ERBB3-WT e ERBB2 (Figura 18). Isto foi ainda confirmado pelos elevados níveis de heterodímeros de superfície de célula em células BaF3 expressando mutante ERBB3/ERBB2, cultivados na ausência de IL-3 ou NRG1, usando ensaio de ligação de proximidade (Soderberg *et al. Nat Methods* **3**, 995-1000 (2006)) (Figura 19 e Figura 20A-B) quando comparados com células expressando ERBB3-WT/ERBB2. Estes dados sugerem que os mutantes ERBB3, em combinação com ERBB2, são capazes de promover sobrevivência de IL-3 de BaF3 de uma maneira independente de NRG1.

[00292] Tendo estabelecido que os mutantes ERBB3 podem sinalizar independente de ligante, nós testamos se sua atividade poderia ser aumentada por adição de ligante. Nós concluímos que NRG1 era incapaz de suportar sobrevivência de células BaF3 expressando ERBB3-WT ou os mutantes sozinhos (Figura 20C). No entanto, na mais alta concentração testada, aumentou a sobrevivência independente de IL-3-de células BaF3 expressando uma maioria dos mutantes ERBB3 junto com o ERBB2, de uma maneira similar às células expressando ERBB3-WT/ERBB2 (Figura 21). De modo interessante, o mutante A232V ERBB3, como o WT ERBB3, mostrou uma resposta de sobrevivência independente de IL-3-dependente de dose de NRG1 (Figura 21). Em contraste, G284R e Q809R não mostraram um aumento significativo em sobrevivência em seguida a adição de ligante quando comparado com células não tratadas expressando estes mu-

tantes. A resposta mínima à adição de ligante por mutantes de domínio cinase G284R ECD e Q809R sugere um papel dominante para o modo independente de ligante de sinalização por estes mutantes (Figura 21). Consistente com isto, seguindo a adição de ligante, embora o P262H e o WT ERBB3 mostrassem elevada formação de heterodímero, o mutante ECD G284R e o mutante de domínio cinase Q809R mostrassem apenas um aumento modesto em formação de heterodímero quando comparado com as células não estimuladas (Figura 18). Estes resultados mostram que embora todos os mutantes ERBB3 sejam capazes de sinalização independente de ligante, alguns deles são ainda capazes de responder a estimulação de ligante.

[00293] Para ainda compreender o mecanismo pelo qual os mutantes ERBB3 promovem sinalização oncogênica, nós testamos a dependência de ligante dos mutantes ERBB3 em nosso sistema BaF3 tratando estas células com dose crescente de um anticorpo anti-NGR1 de neutralização de ligante ERBB3 (Hegde et al. (2011) *supra*). Nós concluímos que a adição de um anticorpo de neutralização de NRG1 (*Id.*) não tinha efeito na capacidade dos mutantes ERBB3 promoverem sobrevivência independente de IL-3 (Figura 37G). Na Figura 37H, mutantes ERBB3 ECD mostram elevada sobrevivência de BaF3 independente de IL-3 em resposta a dose crescente de NRG1 exógeno.

Mutantes ERBB3 promovem oncogênese in vivo

[00294] Nós e outros mostramos que células BaF3, tornadas independentes de IL-3- por expressão ectópica de oncogenes, promovem doença tipo leucemia quando implantadas em camundongos e levam a sobrevivência global reduzida (Horn *et al. Oncogene* **27**, 4096-4106 (2008); Jaiswal *et al. Cancer Cell* **16**, 463-474 (2009)). Nós testamos a capacidade de células BaF3 expressando ERBB3-WT, mutantes ECD (P262H ou G284R) ou o mutante ERBB3 de domínio cinase (Q809R) em combinação com ERBB2 para sua capacidade de promover doen-

ça tipo leucemia. Células BaF3 transduzidas com ERBB3-WT sozinho ou ERBB2 junto com vetor vazio foram usadas como controles. Nós concluímos que camundongos transplantados com células BaF3 expressando mutantes ERBB3 junto com ERBB2 mostravam uma sobrevivência mediana de 22 a 27 dias (Figura 22). Em contraste, camundongos recebendo células BaF3 expressando ou ERBB3-WT sozinho ou ERBB2 com vetor vazio estavam todos vivos ao fim do período de estudo de 60-dias. No entanto, animais recebendo células BaF3 coexpressando ERBB3-WT e ERBB2 desenvolveram doença tipo leucemia com uma latência significativamente mais longa (39 dias; Figura 22). Embora as células BaF3 ERBB3-WT/ERBB2 *in vitro* não mostrassem independência de IL-3, sua atividade no modelo animal é provavelmente devida à presença de fatores de crescimento e citocinas no ambiente *in vivo* que pode ativar dímeros ERBB3-WT/ERBB2 e em parte devida à sinalização dependente de ligante reportada para heterodímeros ERBB3-ERBB2 (Junttila *et al. Cancer Cell* **15**, 429-440 (2009)). Para acompanhar a progressão da doença nós conduzimos necrópsias aos 20 dias em coorte adicional de três camundongos por tratamento. Amostras de medula óssea, baço e fígado destes animais foram revistas para anormalidades patológicas. Quando as células BaF3 foram marcadas com eGFP, nós examinamos medula óssea e baço isolados para células infiltrantes por classificação de célula ativada por fluorescência (FACS). Consistente com a sobrevivência diminuída, medula óssea e baço de camundongos transplantados com células expressando mutantes ERBB3/ERBB2 mostraram proporção significativa de células eGFP positivas infiltrantes em comparação com medula óssea e baço de camundongos recebendo ERBB3-WT ou ERBB2/células de controle de vetor vazio (Figuras 23-26). Além disso, em acordo com a latência mais longa observada, um nível muito baixo de células eGFP positivas infiltrantes foi detectado no fígado e baço de

animais recebendo células ERBB3-WT/ERBB2-WT. Além disso, animais do braço ERBB3 mutante/ERBB2 mostraram baço (Figura 25A e Figura 27) e fígado (Figura 25B e Figura 27) de tamanho e peso aumentados em comparação com controle de vetor vazio ou ERBB3-WT/ERBB2 aos 20 dias, confirmando ainda a presença de células infiltrantes. Adicionalmente, a avaliação histológica de seções de medula óssea, baço e fígado coradas com hematoxilina e eosina (H&E) mostrou infiltração significativa de blastos em animais com células expressando mutante ERBB3/ERBB2 quando comparada ao controle no dia 20 (Figura 26). Estes resultados demonstram o potencial oncogênico *in vivo* dos mutantes ERBB3.

Terapêuticos direcionados são eficazes contra mutantes ERBB3

[00295] Múltiplos agentes que direcionam os receptores ERBB diretamente são aprovados para tratar vários cânceres (Baselga and Swain *Nature Reviews Cancer* **9**, 463-475 (2009); Alvarez *et al. Journal of Clinical Oncology* **28**, 3366-3379 (2010)). Vários fármacos candidatos adicionais que direcionam membros da família ERBB, incluindo ERBB3, e seus componentes a jusante estão em vários estágios de testes clínicos e desenvolvimento (Alvarez *et al. Journal of Clinical Oncology* **28**, 3366-3379 (2010)). Testam-se trastuzumabe - um anticorpo anti-ERBB2 que liga domínio IV de ERBB2 (Junttila *et al. Cancer Cell* **15**, 429-440 (2009)), pertuzumabe - um anticorpo anti-ERBB2 que liga domínio II de ERBB2 e evita dimerização (Junttila *et al. Cancer Cell* **15**, 429-440 (2009)), anti-ERBB3.1 - um anti-ERBB3 que bloqueia ligação de ligante (liga domínio III) (Schaefer, G. *et al. Cancer Cell* (2011)), anti-ERBB3.2 - um anticorpo anti-ERBB3 que liga domínio III e bloqueia ligação de ligante (Wilson *et al. Cancer Cell* **20**, 158-172 (2011)), MEHD7945A - um anticorpo ERBB3/EGFR dual que bloqueia ligação de ligante (liga domínio III de EGFR e ERBB3) (Schaefer, G. *et al. Cancer Cell* (2011)), cetuximabe - um anticorpo EGFR que bloqueia

ligação de ligante (liga ao domínio III de EGFR) (Li, S. *et al. Cancer Cell* **7**, 301-311 (2005)), Lapatinib (Medina, P. J. & Goodin, S. *Clin Ther* **30**, 1426-1447 (2008)) – um inibidor de molécula pequena ERBB2/EGFR dual e GDC-0941 (Edgar, K. A. *et al. Cancer Research* **70**, 1164-1172 (2010)) – um inibidor de PI3K, para seu efeito no bloqueio de proliferação de célula e formação de colônia usando o sistema BaF3 (Figura 28, Figura 29 e Figura 30). Nós também testamos um subconjunto dos anticorpos para *in vivo* para eficácia (Figura 31). Nós descobrimos que em ambos os ensaios de proliferação e formação de colônia, o inibidor molecular pequeno lapatinib é bastante eficaz contra todos os mutantes e GDC-0941 é eficaz contra todos os mutantes testados exceto contra Q809R, onde ele foi parcialmente eficaz na dose testada (Figuras 28 e 29). Entre os anticorpos testados no ensaio de formação de colônia, trastuzumabe anti-ERBB3.2 e MEHD7945A foram todos eficazes contra todos os mutantes testados (Figuras 28 e 29). No entanto, pertuzumabe, anti-ERBB3.1 e GDC-0941 embora muito eficazes no bloqueio de proliferação e formação de colônia induzidas por mutantes ERBB3 ECD, foram apenas modestamente eficazes contra mutante ERBB3 de domínio de cinase Q809R (Figuras 28 e 29). Consistente com isto, *in vitro* em células BaF3 coexpressando mutante ERBB3 e ERBB2, quando eficazes, estes agentes, bloquearam ou reduziram níveis de pAKT e/ou pERK e também os níveis de ERBB3 e/ou pERBB3 (Figura 32 e Figura 33).

[00296] Também testam-se anti-ERBB3.1 e anti-ERBB3.2 contra mutantes ERBB3 G284R e Q809R usando o sistema BaF3 *in vivo* (Figuras 31, 34 e 35). Como observado *in vitro*, trastuzumabe foi muito eficaz no bloqueio de doença tipo leucemia em camundongos recebendo BaF3 expressando ERBB3/ERBB2 G284R ou Q809R (Figura 31A). Similarmente, ambos anti-ERBB3.1 e anti-ERBB3.2 bloquearam o desenvolvimento de doença tipo leucemia em camundongos rece-

bendo BaF3 coexpressando ERBB3-ECD G284R e ERBB2 (Figura 31A). No entanto, estes anticorpos anti-ERBB3 foram apenas parcialmente eficazes no bloqueio de desenvolvimento de doença em camundongos recebendo células BaF3 expressando Q809R ERBB3/ERBB2, embora eles melhorassem significativamente a sobrevivência em comparação com animais de controle não tratados (Figura 31B). Consistente com a eficácia observada para os terapêuticos de alvo nós encontramos uma diminuição significativa em células BaF3 infiltrantes expressando os mutantes ERBB3 no baço e na medula óssea (Figura 34 e Figura 36). Concomitante com a infiltração reduzida de células BaF3 observada, os pesos de baço e fígado estavam dentro da faixa normal esperada para camundongos nus Balb/C (Figura 35 e Figura 25). Estes dados indicam que múltiplos terapêuticos, seja em desenvolvimento ou aprovados para uso humano, podem ser eficazes contra tumores conduzidos por mutante ERBB3.

[00297] Neste estudo nós reportamos a identificação de mutações somáticas ERBB3 frequentes em cânceres de cólon e gástrico. Várias das mutações que nós identificamos ocorrem em múltiplas amostras independentes formando hotspots característicos de mutações oncogênicas.

[00298] Estes estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* demonstram a natureza oncogênica de ambas as mutações ECD e ERBB3 de domínio cinase. Além disso, usando experimentos de titulação de ligante nós mostramos que alguns dos mutantes ECD, V104M, P262H, Q284R e T389K, embora oncogênicos na ausência de ligante ERBB3 NRG1, podem ainda ser estimulados pela adição de NRG1. Mutações ECD podem deslocar o equilíbrio entre ERBB3 ECD amarrado e desamarrado em direção a uma confirmação desamarrada relativa ao WT.

[00299] Tendo testado vários agentes terapêuticos para sua utilida-

de no direcionamento de sinalização oncogênica conduzida por mutante ERBB-3 tanto *in vitro* quanto *in vivo*, nós descobrimos que múltiplos inibidores de molécula pequena, anticorpos anti-ERBB2 e anti-ERBB3 ECD são bastante eficazes no bloqueio de sinalização oncogênica por uma maioria dos mutantes ERBB3 testados. De modo interessante, pertuzumabe, anti-ERBB3.1 e GDC-0941 não foram tão eficazes no bloqueio do mutante de domínio cinase Q809R, indicando um modo distinto de ação por este mutante. Estudos anteriores mostraram que embora pertuzumabe seja bastante eficaz no bloqueio de dimerização ERBB3/ERBB2 mediada por ligante, trastuzumabe é mais eficaz no bloqueio da formação de dímero ERBB2/ERBB3 independente de ligante (Junttila, T. T. *et al. Cancer Cell* **15**, 429-440 (2009)). Consistente com isto, o mutante ERBB3 Q809R de domínio cinase não responsivo a ligante é muito mais responsivo à inibição por trastuzumabe em comparação com pertuzumabe sugerindo um papel potencial para um complexo heterodimérico não ligado em sinalização de Q809R ERBB3. Embora o inibidor PI3K GDC-0941 seja bastante ativo contra a maioria dos mutantes ERBB3 testados, sua eficácia reduzida no bloqueio do mutante Q809R de domínio cinase sugere o engajamento de outras moléculas de sinalização a jusante, além da PI3Kinase.

Knock-downs de ERBB3 mediado por shRNA afeta crescimento in vivo

[00300] Tendo estabelecido a atividade oncogênica de mutantes ERBB3 em células IMCE, nós procuramos testar o efeito de knocking down de ERBB3 em linhagens de célula de tumor. Um estudo recente reportou CW-2, uma linhagem de célula de cólon, e DV90, uma linhagem de pulmão, que expressam mutantes ERBB3 E928G e V104M, respectivamente. Nós geramos linhagens de células CW-2 e DV90 estáveis que expressam um shRNA indutível por doxiciclina (dox) que tem como alvo ERBB3 usando constructos de alvo publicados anteri-

ormente (Garnett et al. (2012) Nature 483, 570-575). Nós também geramos linhagens de controle que expressavam um sequenciamento alvo de luciferase (luc) indutível por dox. Mediante indução por dox, em contraste com linhagens de expressão luc shRNA, níveis de ERBB3 e pERK foram diminuídos em células que expressavam o ERBB3 shRNA (Figura 38A-B). Consistente com a perda de ERBB3 em seguida a indução por dox tanto DV90 quanto CW-2 mostraram crescimento independente de ancoragem reduzido em comparação com linhagens luciferase shRNA ou linhagens não induzidas (Figura 38C-F). Nós a seguir testamos se knockdown de ERBB3 em células DV90 e CW-2 poderia afetar sua capacidade para formar tumores *in vivo*. Mediante indução mediada por dox de ERBB3 tendo como alvo shRNA, concluímos que células tanto DV90 quanto CW-2 mostraram uma diminuição significativa em crescimento de tumor em comparação com animais carregando células DV90 ou CW-2 que expressavam luc-shRNA ou não eram induzidas para expressar o ERBB3 shRNA (Figure 38G-J). Estes dados tomados juntos ainda confirmam o papel de mutações ERBB3 em tumorigênese.

REIVINDICAÇÕES

1. Agente de detecção de câncer gastrointestinal ErbB3, caracterizado pelo fato de que compreende um reagente capaz de ligar especificamente a uma mutação ErbB3 em uma sequência de ácido nucleico ErbB3.

2. Agente de detecção de câncer, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico ErbB3 compreende SEQ ID NO:3 ou 1.

3. Agente de detecção de câncer, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente compreende um polinucleotídeo de Fórmula (I)

5' X_a -Y- Z_b 3' Fórmula (I),

na qual

X é um ácido nucleico e a está entre cerca de 0 e cerca de 250;

Y é um códon de mutação ErbB3; e

Z é um ácido nucleico e b está entre cerca de 0 e cerca de 250;

4. Agente de detecção de câncer, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o códon de mutação codifica (i) um aminoácido em uma posição de SEQ ID NO:2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089 e 1164; ou (ii) um códon de parada na posição 193.

5. Método para determinar a presença de câncer gastrointestinal ErbB3 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo uma mutação em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição da sequência de aminoácido ErbB3, e sendo que

a mutação é indicativa de um câncer gastrointestinal ErbB3 no indivíduo.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a mutação resultante em uma mudança de aminoácido é em uma posição de SEQ ID NO:2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089, 1164 e 193.

7. Método para determinar a presença de câncer ErbB3 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo na presença ou ausência de uma mutação de aminoácido em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, sendo que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição em SEQ ID NO: 2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089, 1164, 193, 492 e 714, e em que a presença da mutação é indicativa de um câncer ErbB3 no indivíduo.

8. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 7, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar um agente terapêutico ao dito indivíduo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico é um inibidor de ErbB.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ErbB é selecionado do grupo consistindo em um antagonista de EGFR, um antagonista de ErbB2, um antagonista de ErbB3, um antagonista de ErbB4 e um antagonista de EGFR/ErbB3.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o inibidor é um inibidor de molécula pequena.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracte-

rizado pelo fato de que o antagonista é um anticorpo antagonista.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo biespecífico, um anticorpo quimérico, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado e um fragmento de anticorpo.

14. Agente de detecção, de acordo com a reivindicação 1, ou método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o câncer gastrointestinal é câncer gástrico ou câncer de cólon.

15. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o câncer de ErbB3 é selecionado do grupo consistindo em gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma Escamoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), pulmão e pancreático.

16. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 7, caracterizado pelo fato de que ainda compreende (i) identificar o indivíduo em necessidade e/ou (ii) obter a amostra de um indivíduo em necessidade.

17. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 7, caracterizado pelo fato de que a detecção compreende amplificar ou sequenciar a mutação e detectar a mutação ou sequência da mesma.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a amplificação compreende misturar um iniciador de amplificação ou par de iniciadores de amplificação com um gabarito de ácido nucleico isolado da amostra.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o iniciador ou par de iniciadores é complementar ou parcialmente complementar a uma região proximal a ou incluindo

do a dita mutação, e é capaz de indicar polimerização de ácido nucleico por uma polimerase no gabarito de ácido nucleico.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que ainda compreende estender o iniciador ou par de iniciadores em uma reação de polimerização de DNA compreendendo uma polimerase e o ácido nucleico de gabarito para gerar um amplicon.

21. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a mutação é detectada por um processo que inclui uma ou mais de: sequenciar a mutação em um DNA genômico isolado da amostra biológica, hibridizar a mutação ou um amplicon da mesma para uma matriz, digerir a mutação ou um amplicon da mesma com uma enzima de restrição ou amplificação de PCR em tempo real da mutação.

22. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende sequenciar parcialmente ou totalmente a mutação em um ácido nucleico isolado da amostra biológica.

23. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a amplificação compreende realizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR), transcriptase reversa PCR (RT-PCR) ou reação em cadeia da ligase (LCR) usando um ácido nucleico isolado da amostra biológica como um gabarito na PCR, RT-PCR ou LCR.

24. Uso de um agente terapêutico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para preparação de um medicamento para tratar câncer gastrointestinal em um indivíduo em necessidade, sendo que o dito tratamento compreendendo:

(a) detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo uma mutação em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3,

em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição da sequência de aminoácido ErbB3 e em que a mutação é indicativa de um câncer gastrointestinal ErbB3 no indivíduo; e

(b) administrar o dito medicamento compreendendo o dito agente terapêutico ao dito indivíduo.

25. Uso, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a mutação resultante em uma mudança de aminoácido é em uma posição de SEQ ID NO:2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089, 1164 e 193.

26. Uso de um agente terapêutico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para preparação de um medicamento para tratar um câncer de ErbB3 em um indivíduo, o dito tratamento compreendendo:

(a) detectar em uma amostra biológica obtida do indivíduo a presença ou ausência de uma mutação de aminoácido em uma sequência de ácido nucleico codificando ErbB3, em que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido em pelo menos uma posição em SEQ ID NO: 2 selecionada do grupo consistindo em 104, 809, 232, 262, 284, 325, 846, 928, 60, 111, 135, 295, 406, 453, 498, 1089, 1164, 193, 492 e 714, e em que a presença da mutação é indicativa de um câncer ErbB3 no indivíduo; e

(b) administrar o dito medicamento compreendendo o dito agente terapêutico ao dito indivíduo.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 24 ou 26, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico é um inibidor de ErbB.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ErbB é selecionado do grupo consistindo em um antagonista de EGFR, um antagonista de ErbB2, um an-

tagonista de ErbB3, um antagonista de ErbB4 e um antagonista de EGFR/ErbB3.

29. Uso, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o antagonista é um inibidor de molécula pequena.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o antagonista é um anticorpo antagonista.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo biespecífico, um anticorpo quimérico, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado e um fragmento de anticorpo.

32. Uso, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o câncer gastrointestinal é câncer gástrico ou câncer de cólon.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o câncer de ErbB3 é selecionado do grupo consistindo em gástrico, de cólon, esofágico, retal, cecal, adenocarcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), NSCLC (Carcinoma Escamoso), carcinoma renal, melanoma, ovariano, célula grande de pulmão, câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), hepatocelular (HCC), pulmão e pancreático.

Fig.1A

Amostras						
ID da Amostra	Nome Src	Id de amostra Normal Coincidente	Categoria da Doença	Subcategoria do Tecido	Diagnóstico do Tecido	Sequencia mento de exoma Total (WES)
86336	HF-1327	87321	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
94592	HF-17829-(2)	94591	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95504	HF-18430-(1)	95508	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95735	HF-18040-(1)	95739	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96115	HF-18138-(1)	96119	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96157	HF-18152-(1)	96161	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96391	HF-18172-(1)	96395	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96445	HF-18190-(1)	96449	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96562	HF-18454-(1)	96566	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96737	HF-18500-(1)	96741	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
101763	HF-17944-(1)	101761	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
94200	HF-17545-(1)	94190	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
101592	HF-20325-(1)	101590	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
86582	HF-15220-(1)	86927	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100695	HF-19917-(1)	100693	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86337	HF-1480	87322	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
86337	HF-1480	87322	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
86337	HF-1480	87322	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
86341	HF-2468	87326	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
86342	HF-2525	87327	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
86343	HF-3446	87328	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
86345	HF-3602	87330	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95147	HF-17899-(1)	95146	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95165	HF-17930-(1)	95164	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95356	HF-18263-(1)	95354	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95362	HF-18277-(1)	95360	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95374	HF-18295-(1)	95372	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95498	HF-18428-(1)	95502	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95669	HF-18026-(1)	95673	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95681	HF-18030-(1)	95685	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95687	HF-18032-(1)	95691	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95699	HF-18036-(1)	95703	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95729	HF-17998-(1)	95733	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95956	HF-18092-(1)	95960	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96121	HF-18140-(1)	96125	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96139	HF-18146-(1)	96143	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96145	HF-18148-(1)	96149	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96205	HF-18158-(1)	96209	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96496	HF-18198-(1)	96500	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96630	HF-18470-(1)	96634	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96654	HF-18478-(1)	96658	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96689	HF-18418-(1)	96693	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim

Fig. 1B

96689	HF-18418-(1)	96693	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96719	HF-18494-(1)	96723	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96725	HF-18496-(1)	96729	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96767	HF-18512-(1)	96771	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96876	HF-18550-(1)	96880	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96951	HF-18572-(1)	96955	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97041	HF-18596-(1)	97045	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97059	HF-18602-(1)	97063	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97075	HF-18604-(1)	97079	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97101	HF-18612-(1)	97105	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97458	HF-18301-(1)	97456	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
97509	HF-17958-(1)	97507	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97672	HF-18319-(1)	97670	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97938	HF-18315-(1)	97936	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97944	HF-18359-(1)	97942	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
97950	HF-18361-(1)	97948	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
98491	HF-18824-(1)	98489	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
101775	HF-18267-(1)	101773	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
101787	HF-18281-(1)	101785	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
101886	HF-20391-(1)	101884	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
86339	HF-2400	87324	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
86340	HF-2408	87325	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95149	HF-17903-(1)	95148	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95221	HF-17942-(1)	95219	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95462	HF-18339-(1)	95460	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95595	HF-18006-(1)	95599	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
95705	HF-18038-(1)	95709	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95717	HF-17994-(1)	95721	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95753	HF-18046-(1)	95757	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95897	HF-18074-(1)	95901	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
95909	HF-18078-(1)	95913	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96056	HF-18118-(1)	96060	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96241	HF-18170-(1)	96245	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96409	HF-18178-(1)	96413	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96502	HF-18434-(1)	96506	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96514	HF-18438-(1)	96518	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96618	HF-18466-(1)	96622	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96624	HF-18468-(1)	96628	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96672	HF-18484-(1)	96676	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96791	HF-18520-(1)	96795	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96810	HF-18528-(1)	96814	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96828	HF-18534-(1)	96832	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96894	HF-18556-(1)	96898	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96918	HF-18564-(1)	96922	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96945	HF-18570-(1)	96949	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
96963	HF-18576-(1)	96967	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
96969	HF-18578-(1)	96973	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97005	HF-18504-(1)	97009	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim

Fig. 1C

97047	HF-18598-(1)	97051	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97053	HF-18600-(1)	97057	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma Mucinoso	sim
97636	HF-17909-(1)	97634	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97932	HF-18285-(1)	97930	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
97968	HF-18796-(1)	97966	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
98083	HF-18253-(1)	98079	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
98107	HF-18323-(1)	98103	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
98123	HF-18327-(1)	98119	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
98473	HF-18818-(1)	98471	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
101904	HF-20397-(1)	101902	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
101910	HF-20399-(1)	101908	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	
101922	HF-20403-(1)	101920	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
101988	HF-20385-(1)	101986	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
103183	HF-20411-(1)	103181	Câncer Colorretal		Adenocarcinoma	sim
88024	HF-7083-(1)	88023	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
88026	HF-7969-(1)	88025	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
88028	HF-8020-(1)	88027	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
88173	HF-9229-(1)	88172	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
88175	HF-16285-(1)	88174	Câncer Esofágico		Carcinoma das Células Escamosas	
94018	HF-6467-(1)	94017	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
94020	HF-6966-(1)	94019	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
94021	HF-7046-(1)	94022	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
94024	HF-7063-(1)	94023	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
98623	HF-17232-(1)	98626	Câncer Esofágico		Adenocarcinoma	
98646	HF-18367-(1)	98644	Câncer Esofágico		Carcinoma	
99093	HF-19089-(1)	99091	Câncer Esofágico		Carcinoma	
100663	HF-19429-(1)	100667	Câncer Esofágico		Carcinoma	
101450	HF-20081-(1)	101448	Câncer Esofágico		Carcinoma das Células Escamosas	
101474	HF-20333-(1)	101472	Câncer Esofágico		Carcinoma das Células Escamosas	
92180	HF-17152-(1)	92188	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
94203	HF-17546-(1)	94191	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
94383	HF-17266-(1)	94386	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
94420	HF-17579-(1)	94419	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
94432	HF-17699-(1)	94431	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
94472	HF-17566-(1)	94471	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
98433	HF-18840-(1)	98431	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
98439	HF-18842-(1)	98437	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
98982	HF-19113-(1)	98980	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
101574	HF-20319-(1)	101572	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
101598	HF-20327-(1)	101596	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
92175	HF-17145-(1)	92184	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
92192	HF-17240-(1)	92193	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
94218	HF-17551-(1)	94196	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
94227	HF-17554-(1)	94199	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
94263	HF-17159-(1)	94266	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
94303	HF-17188-(1)	94306	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
94307	HF-17189-(1)	94310	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
94315	HF-17197-(1)	94318	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	

Fig. 1D

97696	HF-18844-(1)	97694	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
97708	HF-18848-(1)	97706	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
97714	HF-18850-(1)	97712	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
98204	HF-17945-(1)	98208	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
98248	HF-18377-(1)	98246	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
98409	HF-18832-(1)	98407	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
98427	HF-18838-(1)	98425	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
98964	HF-19107-(1)	98962	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
99935	HF-19354-(1)	99939	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
100003	HF-20021-(1)	100001	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Difuso	
100543	HF-19412-(1)	100547	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
100549	HF-19437-(1)	100553	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
91925	HF-17225-(1)	91928	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
88167	HF-16443	88168	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
88170	HF-16920	88169	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
89942	HF-17078-(1)	91910	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
91913	HF-17079-(1)	91916	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
91919	HF-17224-(1)	91922	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
91931	HF-17229-(1)	91934	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
91937	HF-17268-(1)	91940	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
98747	HF-17493-(1)	98746	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
98751	HF-17499-(1)	98750	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
98755	HF-17592-(1)	98754	Carcinoma Hepatocelular		Carcinoma Hepatocelular	
86795	HF-15545-(1)	87704	Câncer de Pulmão, Outro		Carcinoma Neuroendócrino	
88122	HF-16884	88121	Melanoma		Melanoma	
88124	HF-16888	88123	Melanoma		Melanoma	
88126	HF-16890	88125	Melanoma		Melanoma	
88128	HF-16892	88127	Melanoma		Melanoma	
91780	HF-16922-(1)	91779	Melanoma		Melanoma	
91816	HF-17686-(1)	91815	Melanoma		Melanoma	
91818	HF-17687-(1)	91817	Melanoma		Melanoma	
91820	HF-17688-(1)	91819	Melanoma		Melanoma	
91822	HF-17689-(1)	97144	Melanoma		Melanoma	
91824	HF-17690-(1)	91823	Melanoma		Melanoma	
95283	HF-18230-(1)	95286	Melanoma		Melanoma	
95288	HF-18233-(1)	95291	Melanoma		Melanoma	
97775	HF-18686-(1)	97779	Melanoma		Melanoma	
97781	HF-18689-(1)	97785	Melanoma		Melanoma	
97805	HF-18719-(1)	97809	Melanoma		Melanoma	
97856	HF-18787-(1)	97848	Melanoma		Melanoma	
97864	HF-18789-(1)	97852	Melanoma		Melanoma	
97868	HF-18790-(1)	97854	Melanoma		Melanoma	
97884	HF-18882-(1)	97888	Melanoma		Melanoma	
97890	HF-18884-(1)	97894	Melanoma		Melanoma	
97896	HF-18886-(1)	97900	Melanoma		Melanoma	
99878	HF-19011-(1)	99882	Melanoma		Melanoma	
101504	HF-20337-(1)	101502	Melanoma		Melanoma	
101516	HF-20341-(1)	101514	Melanoma		Melanoma	

Fig. 1E

88130	HF-16894	88129	Melanoma		Melanoma	
88131	HF-16873	88132	Melanoma		Melanoma	
91812	HF-17684-(1)	91811	Melanoma		Melanoma	
91826	HF-17691-(1)	91825	Melanoma		Melanoma	
95305	HF-18385-(1)	108057	Melanoma		Melanoma	
97793	HF-18713-(1)	97797	Melanoma		Melanoma	
97844	HF-18782-(1)	97842	Melanoma		Melanoma	
97860	HF-18788-(1)	97850	Melanoma		Melanoma	
99125	HF-19099-(1)	99123	Melanoma		Melanoma	
99852	HF-18692-(1)	99855	Melanoma		Melanoma	
99871	HF-19008-(1)	99875	Melanoma		Melanoma	
101486	HF-20013-(1)	101484	Melanoma		Melanoma	
101498	HF-20335-(1)	101496	Melanoma		Melanoma	
86318	HF-11765	87234	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86327	HF-11754	87229	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
86501	HF-11731	87221	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86503	HF-11734	87223	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86506	HF-11743	87226	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86507	HF-11744	87694	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86507	HF-11744	87694	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86507	HF-11744	87694	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86564	HF-4810-(1)	86858	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86570	HF-3711-(1)	86855	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86578	HF-8025	87238	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86583	HF-15224-(1)	86928	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86748	HF-15355-(1)	87236	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86751	HF-11757-(2)	87695	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86770	HF-15217	86925	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86775	HF-15515-(1)	87405	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86783	HF-15533-(1)	87415	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86786	HF-15539-(1)	87418	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86789	HF-15567-(1)	87428	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
86790	HF-15570-(1)	87429	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86792	HF-15505-(1)	87430	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86796	HF-15546-(1)	87421	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86796	HF-15546-(1)	87421	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86796	HF-15546-(1)	87421	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86798	HF-15549-(1)	87423	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	

Fig. 1F

86316	HF-11756	87230	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86319	HF-11766	87696	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86320	HF-11770	86842	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86321	HF-11772	86844	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86322	HF-11776	86846	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86324	HF-11782	86848	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86325	HF-11751	87227	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86326	HF-11752	87228	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86328	HF-11758	87231	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86329	HF-11763	87233	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86330	HF-11767	87235	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
86331	HF-11771	86843	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86332	HF-11780	86847	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
86333	HF-11783	86849	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
86334	HF-11785	86850	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86502	HF-11732	87222	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86504	HF-11737	87224	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86505	HF-11739	87225	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86563	HF-3043-(1)	86852	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86565	HF-5158-(1)	86859	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86566	HF-8890-(1)	86862	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86567	HF-9390-(1)	86864	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86568	HF-3703-(1)	86853	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86569	HF-3705-(1)	86854	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86571	HF-3718-(1)	86856	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86572	HF-4527-(1)	86857	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86576	HF-5171	86860	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86579	HF-15212-(1)	86922	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86580	HF-15215-(1)	86924	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86581	HF-15218-(1)	86926	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86584	HF-15227-(1)	86929	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86586	HF-15231-(1)	86932	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86587	HF-15233-(1)	86933	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86590	HF-15237-(1)	86934	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	

Fig. 1G

86591	HF-15240-(1)	86935	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86752	HF-11769-(2)	87697	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86753	HF-11775-(2)	86845	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86769	HF-15213	86923	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86771	HF-15228	86930	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86772	HF-15506-(1)	87402	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86773	HF-15511-(1)	87403	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86774	HF-15512-(1)	87404	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma Mucinoso	
86776	HF-15516-(1)	87406	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86782	HF-15527-(1)	87414	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86784	HF-15534-(1)	87416	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86785	HF-15535-(1)	87417	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86791	HF-15541-(1)	87419	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86794	HF-15523-(1)	87411	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86797	HF-15547-(1)	87422	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86799	HF-15558-(1)	87424	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86800	HF-15559-(1)	87425	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86801	HF-15560-(1)	87426	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86802	HF-15561-(1)	87427	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86803	HF-15563-(1)	87705	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86835	HF-15576-(1)	97838	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86839	HF-15598-(1)	87699	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86778	HF-15521-(1)	87409	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86779	HF-15522-(1)	87410	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
94671	HF-15894-(1)	106531	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
94699	HF-15901-(1)	106533	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
94795	HF-15928-(1)	106537	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
98019	HF-15878-(1)	106529	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
98860	HF-18620-(1)	98864	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
98896	HF-18632-(1)	98900	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
100615	HF-19424-(1)	100619	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100627	HF-19441-(1)	100631	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
100641	HF-19967-(1)	100639	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101043	HF-20009-(1)	101041	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	

Fig. 1H

101213	HF-20138-(1)	101217	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
101286	HF-20122-(1)	101290	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101359	HF-20166-(1)	101363	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101384	HF-20174-(1)	101388	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101668	HF-20305-(1)	101666	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
103001	HF-20502-(1)	103005	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86323	HF-11779	105597	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86575	HF-2130	86851	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86585	HF-15230-(1)	86931	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86588	HF-15234-(1)	87698	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86749	HF-15358-(1)	87237	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma Bronchioloalveolar	
86777	HF-15520-(1)	87408	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86780	HF-15525-(1)	87412	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86781	HF-15526-(1)	87413	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86787	HF-15540-(1)	87703	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
86788	HF-15542-(1)	87420	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
86793	HF-15519-(1)	87407	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
87967	HF-15503-(1)	87968	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
87969	HF-15487-(1)	87970	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
87971	HF-15479-(1)	87972	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
88177	HF-16076-(1)	88176	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Outro	
89960	HF-15476-(1)	89958	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
94675	HF-15895-(1)	106532	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
94759	HF-15854-(1)	106541	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
98004	HF-15912-(1)	106535	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
98007	HF-15913-(1)	106536	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
98010	HF-15850-(1)	106528	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
98681	HF-18664-(1)	98685	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
98850	HF-18407-(1)	98848	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
98884	HF-18628-(1)	98888	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
99277	HF-18639-(1)	99273	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Outro	
99283	HF-18643-(1)	99281	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Outro	
99319	HF-18655-(1)	99311	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100635	HF-19913-(1)	100633	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	

Fig. 11

100683	HF-19911-(1)	100681	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100701	HF-19919-(1)	100699	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
100739	HF-19931-(1)	100737	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100751	HF-19935-(1)	100749	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100783	HF-19945-(1)	100781	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100789	HF-19947-(1)	100787	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100831	HF-19953-(1)	100829	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
100837	HF-19955-(1)	100835	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
100849	HF-19959-(1)	100847	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100867	HF-19965-(1)	100865	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100879	HF-19973-(1)	100877	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
100918	HF-19977-(1)	100916	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
100960	HF-19991-(1)	100958	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101007	HF-19995-(1)	101005	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma Mucinoso	
101037	HF-20007-(1)	101035	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
101119	HF-19907-(1)	101117	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101125	HF-20005-(1)	101123	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101189	HF-20130-(1)	101193	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
101201	HF-20134-(1)	101205	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
101225	HF-20142-(1)	101229	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101317	HF-20152-(1)	101321	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
101335	HF-20158-(1)	101339	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
101704	HF-20317-(1)	101702	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
101714	HF-20348-(1)	101718	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
102004	HF-16447-(1)	102008	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
103044	HF-20520-(1)	103048	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
103082	HF-20516-(1)	103086	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma de Células Grandes	
103591	HF-20701-(1)	103590	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
103599	HF-20705-(1)	103598	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
103603	HF-20707-(1)	103602	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
103645	HF-20697-(1)	103643	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Adenocarcinoma	
103651	HF-20699-(1)	103649	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas		Carcinoma das Células Escamosas	
90563	HF-17060-(1)	90566	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Endometrióide	
92119	HF-16150-(1)	92118	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
92124	HF-16277-(1)	92122	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	

Fig. 1J

98164	HF-18393-(1)	98162	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma	
98598	HF-18770-(1)	98596	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
88013	HF-16897-(1)	88014	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Endometrióide	
88015	HF-16899-(1)	88019	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
88016	HF-16901-(1)	88020	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
88017	HF-16902-(1)	88021	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Endometrióide	
88018	HF-16903-(1)	88022	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
90528	HF-17525-(1)	90527	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
90540	HF-17528-(1)	90539	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
90552	HF-17531-(1)	90551	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Endometrióide	
90574	HF-17532-(1)	90571	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Endometrióide	
92121	HF-16154-(1)	92120	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
92125	HF-16280-(1)	92123	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
92439	HF-17778-(1)	92440	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
92441	HF-17780-(1)	92442	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
92445	HF-17786-(1)	92446	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
92447	HF-17788-(1)	92448	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
98170	HF-18395-(1)	98168	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroas	
98188	HF-18401-(1)	98186	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
98200	HF-18405-(1)	98198	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
98561	HF-17782-(1)	98564	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
98586	HF-18389-(1)	98584	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
98610	HF-18774-(1)	98608	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Papilar Seroso	
99024	HF-19073-(1)	99022	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
99048	HF-19081-(1)	99046	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
99054	HF-19083-(1)	99052	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
100799	HF-19319-(1)	100803	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
100811	HF-19328-(1)	100815	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
100817	HF-19330-(1)	100821	Câncer de Ovário		Adenocarcinoma Seroso	
88181	HF-16365-(1)	90270	Câncer Pancreático		Adenocarcinoma	
87862	HF-3087-(1)	87861	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100434	HF-19435-(1)	100438	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100494	HF-20041-(1)	100492	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
86367	HF-2179-(1)	90236	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
86368	HF-3058-(1)	90237	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
86369	HF-3455-(1)	90238	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
87860	HF-3081-(1)	87859	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
87864	HF-7279-(1)	87863	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
87870	HF-7997-(1)	87869	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
87876	HF-9227-(1)	87875	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
87977	HF-4328-(1)	87978	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
87979	HF-4336-(1)	87980	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
87987	HF-9479-(1)	87990	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
89943	HF-8979-(2)	87877	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
89944	HF-9159-(2)	87873	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
90142	HF-6445-(1)	90139	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
90160	HF-7010-(1)	90157	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
90212	HF-8988-(2)	90210	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	

Fig. 1K

100388	HF-19301-(1)	100392	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100394	HF-19303-(1)	100398	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100400	HF-19305-(1)	100404	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100412	HF-19311-(1)	100416	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100428	HF-19317-(1)	100432	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100446	HF-20025-(1)	100445	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100452	HF-20027-(1)	100450	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100458	HF-20029-(1)	100456	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100563	HF-20069-(1)	100561	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100569	HF-20071-(1)	100567	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100575	HF-20073-(1)	100573	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100581	HF-20075-(1)	100579	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100587	HF-20077-(1)	100585	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
100593	HF-20079-(1)	100591	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102061	HF-20053-(1)	102048	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102065	HF-20061-(2)	102055	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102321	HF-20426-(1)	102325	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102333	HF-20430-(1)	102337	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102396	HF-20438-(1)	102400	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102402	HF-20441-(1)	102406	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102408	HF-20444-(1)	102426	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102743	HF-20462-(1)	102747	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102749	HF-20466-(1)	102753	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102773	HF-20490-(1)	102777	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102785	HF-20494-(1)	102789	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102828	HF-20472-(1)	102832	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
102864	HF-20486-(1)	102868	Carcinoma de Células Renais		Carcinoma de Células Renais	
86457	HF-9739	87805	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
98687	HF-18666-(1)	98691	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
86448	HF-8740	87804	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
98711	HF-18694-(1)	98715	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
98717	HF-18696-(1)	98721	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
98735	HF-18702-(1)	98739	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
98741	HF-18704-(1)	98745	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
98759	HF-17693-(1)	98758	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
101626	HF-20291-(1)	101624	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
101644	HF-20297-(1)	101642	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
101650	HF-20299-(1)	101648	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
103639	HF-20695-(1)	103637	Câncer de Pulmão de Células Pequenas		Carcinoma de Células Pequenas	
94128	HF-17075-(1)	94130	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94117	HF-17111-(1)	94123	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94120	HF-17116-(1)	94126	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94137	HF-17120-(1)	94145	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94138	HF-17121-(1)	94146	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
92177	HF-17149-(1)	92185	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94255	HF-17156-(1)	94258	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94271	HF-17161-(1)	94274	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
98988	HF-19115-(1)		Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	

Fig. 1L

94073	HF-17064-(1)	94082	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94074	HF-17065-(1)	94083	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94327	HF-17186-(1)	94330	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94331	HF-17190-(1)	94334	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
94291	HF-17202-(1)	94294	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94347	HF-17230-(1)	94350	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94175	HF-17119-(1)	94178	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
92174	HF-17144-(1)	92182	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
92176	HF-17147-(1)	92183	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
94247	HF-17154-(1)	94250	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94259	HF-17158-(1)	94262	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94209	HF-17548-(1)	94193	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94444	HF-17581-(1)	588609	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94416	HF-17573-(1)	94415	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
94440	HF-17574-(1)	94439	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Mucinoso	
94408	HF-17495-(1)	588608	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
98216	HF-17975-(1)	98220	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
98260	HF-18381-(1)	98258	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
98224	HF-18369-(1)	98222	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
98230	HF-18371-(1)	98228	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
98236	HF-18373-(1)	98234	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
98242	HF-18375-(1)	98240	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
98421	HF-18836-(1)	98419	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
97726	HF-18854-(1)	97724	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
99947	HF-19360-(1)	99951	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
100025	HF-19366-(1)	100029	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
100031	HF-19368-(1)	100035	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
100055	HF-19376-(1)	100059	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
99905	HF-19336-(1)	99907	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
99929	HF-19346-(1)	99933	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
99977	HF-19352-(1)	99981	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
99955	HF-19105-(1)	99953	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
100061	HF-19378-(1)	100065	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
100085	HF-19386-(1)	100089	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
100091	HF-19388-(1)	100095	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
100097	HF-19390-(1)	100101	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
99997	HF-20019-(1)	99995	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
100121	HF-19398-(1)	100125	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
100127	HF-19400-(1)	100131	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
100519	HF-19404-(1)	100521	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
100531	HF-19408-(1)	100535	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Intestinal	
115584	HF-8126-(1)	115583	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94445	HF-17581-(2)	588609	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94441	HF-17574-(2)	94439	Câncer Gástrico		Adenocarcinoma Mucinoso	
94166	HF-17193-(1)		Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94174	HF-17110-(1)		Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
94464	HF-17568-(1)		Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	
99000	HF-19119-(1)		Câncer Gástrico		Adenocarcinoma	

Fig. 1M

100525	HF-19406-(1)		Cáncer Gástrico			Adenocarcinoma Intestinal	
115582	HF-7113-(1)		Cáncer Gástrico			Adenocarcinoma	
587244	HF-18084-(2)	587245	Cáncer Colorrectal			Adenocarcinoma	sim
587282	HF-18265-(1)	587283	Cáncer Colorrectal		Cólon Sigmoide	Adenocarcinoma	sim
587286	HF-18275-(1)	587287	Ceco			Adenocarcinoma	sim
587298	HF-18309-(1)	587299	Ceco			Adenocarcinoma	sim
587388	HF-20387-(1)	587389	Cáncer Colorrectal		Cólon Sigmoide	Adenocarcinoma	sim
587390	HF-20389-(2)	587391	Recto			Adenocarcinoma	sim

Fig. 2A

```

1  actccagcct  cgcgcgggag  ggggcgcggc  cgtgactcac  ccccttcctt  ctgcgttcct
61  cctccctctt  ctctctctct  ctcacacaca  cacacccttc  ccttgccatc  cctccccgga
121  ctccggetcc  ggctccgatt  gcaatttgca  acctccgctg  ccgtcgccgc  agcagccacc
181  aattcgccag  cgggttcagg  ggctcttgcc  tcgatgtcct  agcctagggg  cccccgggcc
241  ggacttggtt  gggctccctt  caccctctgc  ggagtcatga  gggcgaacga  cgctctgcag
301  gtgctgggct  tgcttttcag  cctggcccgg  ggctccgagg  tgggcaactc  tcaggcagtg
361  tgtcctggga  ctctgaatgg  cctgagtggt  accggcgatg  ctgagaacca  ataccagaca
421  ctgtacaagc  tctacgagag  gtgtgaggtg  gtgatgggga  accttgagat  tgtgtcacg
481  ggacacaatg  ccgacctctc  ctctctgcag  tggattcgag  aagtgcagg  ctatgtcctc
541  gtggccatga  atgaattctc  tactctacca  ttgcccaccc  tccgcgtggt  gcgagggacc
601  caggtctacg  atgggaagtt  tgccatcttc  gtcattgtga  actataacac  caactccagc
661  cacgtctctc  gccagctccg  cttgactcag  ctaccgaga  ttctgtcagg  ggggtgttat
721  attgagaaga  acgataagct  ttgtcacatg  gacacaattg  actggaggga  catcgtgagg
781  gaccgagatg  ctgagatagt  ggtgaaggac  aatggcagaa  gctgtcccc  ctgtcatgag
841  gtttgcaagg  ggcgatgctg  gggtcctgga  tcagaagact  gccagacatt  gaccaagacc
901  atctgtgctc  ctcatgttaa  tggtcactgc  tttgggcccc  accccaacca  gtgctgccat
961  gatgagtggt  ccgggggctg  ctccaggcct  caggacacag  actgctttgc  ctgccggcac
1021  ttcaatgaca  gtggagcctg  tgtacctcgc  tgtccacagc  ctcttgtcta  caacaagcta
1081  actttccagc  tggaaaccaa  tccccacacc  aagtatcagt  atggaggagt  ttgtgtagcc
1141  agctgtcccc  ataactttgt  ggtggatcaa  acatcctgtg  tcagggcctg  tctcctgac
1201  aagatggaag  tagataaaaa  tgggctcaag  atgtgtgagc  ctgtggggg  actatgtccc
1261  aaagcctgtg  agggaaacag  ctctgggagc  cgcttcaga  ctgtggactc  gagcaacatt
1321  gatggatttg  tgaactgcac  caagatcctg  ggcaacctgg  actttctgat  caccggcctc
1381  aatggagacc  cctggcaca  gatccctgcc  ctggaccag  agaagctcaa  tgtcttcgg
1441  acagtacggg  agatcacagg  ttacctgaac  atccagtctt  ggccgcccc  catgcacaac
1501  ttcagtgttt  tttccaattt  gacaaccatt  ggaggcagaa  gcctctacaa  ccgggggctt
1561  tcattgttga  tcatgaagaa  cttgaatgtc  acatctctgg  gcttcogatc  cctgaaggaa
1621  attagtgtct  ggcgtatcta  tataagtgcc  aataggcagc  tctgtacca  ccactctttg
1681  aactggacca  aggtgtctcg  ggggcctacg  gaagagcgac  tagacatcaa  gcataatcgg
1741  ccgcgcagag  actgcgtggc  agagggcaaa  gtgtgtgacc  cactgtgtc  ctctggggga
1801  tgctggggcc  caggccctgg  tcagtgtctg  tctgtcgaa  attatagccg  aggaggtgtc
1861  tgtgtgacct  actgcaactt  tctgaatggg  gagcctcgag  aatttgccca  tgaggccgaa
1921  tgettctcct  gccaccggga  atgccaaccc  atggagggca  ctgccacatg  caatggctcg
1981  ggctctgata  cttgtgtctc  atgtgccc  tttcgagatg  ggccccactg  tgtgagcagc
2041  tgcccccatg  gagtccatag  tgccaagggc  ccaatctaca  agtaccaga  tgttcagaat
2101  gaatgtcggc  cctgccatga  gaactgcacc  cagggggtgt  aaggaccaga  gcttcaagac
2161  tgtttaggac  aaacactgg  gctgatcggc  aaaaccatc  tgacaatggc  tttgacagt
2221  atagcaggat  tggtagtgat  tttcatgatg  ctgggcggca  cttttctcta  ctggcgtggg
2281  cgccggattc  agaataaaa  ggctatgagg  cgatacttgg  aacgggggtg  gagcatagag
2341  cctctggacc  ccagtgaaga  ggctaacaaa  gtcttgccca  gaatcttcaa  agagacagag
2401  ctaagggaag  ttaaagtgt  tggctcgggt  gtctttggaa  ctgtgcacaa  aggagtgtgg
2461  atccctgagg  gtgaatcaat  caagattcca  gtctgcatta  aagtcattga  ggacaagagt
2521  ggacggcaga  gttttcaagc  tgtgacagat  catatgctgg  ccattggcag  cctggaccat
2581  gccacattg  taaggctgt  gggactatgc  ccagggtcat  ctctgcagct  tgtactcaa
2641  tatttgctc  tgggttctct  gctggatcat  gtgagacaac  accggggggc  actggggcca
2701  cagctgtctc  tcaactgggg  agtacaaaatt  gccaggga  tgtactacct  tgaggaaat
2761  ggtatggtgc  atagaaacct  ggctgcccga  aacgtgtctc  tcaagtccac  cagtcaaggt
2821  cagggtggcag  attttggtgt  ggctgacctg  ctgcctcctg  atgataagca  gctgtatac
2881  agtgaggcca  agactccaat  taagtggatg  gcccttgaga  gtatccactt  tgggaaatac
2941  acacaccaga  gtgatgtctg  gagctatgg  gtgacagttt  gggagttgat  gaccttcggg
3001  gcagagccct  atgcagggt  acgattggct  gaagtaccag  acctgctaga  gaagggggag
3061  cggttggcac  agccccagat  ctgcacaatt  gatgtctaca  tgggtgatgg  caagtgttg
3121  atgattgatg  agaacattcg  cccaaccttt  aaagaactag  ccaatgagtt  caccaggatg
3181  gcccgagacc  caccacggta  tctggtcata  aagagagaga  gtgggcctgg  aatagccct
3241  gggccagagc  cccatgggt  gacaaacaag  aagctagagg  aagtagagct  ggagccagaa
3301  ctagacctag  acctagactt  ggaagcagag  gaggacaacc  tggcaaccac  cacactgggc
3361  tccgcctca  gcctaccagt  tggaacactt  aatcgccac  gtgggagcca  gagcctttta

```


Fig. 2B

```

3421 agtccatcat ctggatacat gcccatgaac cagggttaatc ttggggagtc ttgccaggag
3481 tctgcagttt ctgggagcag tgaacggtgc ccccgctccag tctctctaca cccaatgcc
3541 cggggatgcc tggcatcaga gtcacagag gggcatgtaa caggetctga ggctgagctc
3601 caggagaaaag tgtcaatgtg taggagccgg agcaggagcc ggagcccacg gccacgcgga
3661 gatagcgcct accattccca gcgccacagt ctgctgactc ctgttaccce actctcccca
3721 cccgggttag aggaagagga tgtcaacggt tatgtcatgc cagatacaca cctcaaaggt
3781 actccctcct cccgggaagg caccctttct tcagtgggtc tcagttctgt cctgggtact
3841 gaagaagaag atgaagatga ggagtatgaa tacatgaacc ggaggagaag gcacagtcca
3901 cctcatcccc ctaggccaag ttcccttgag gagctgggtt atgagtacat ggatgtgggg
3961 tcagacctca gtgcctctct gggcagcaca cagagtggcc cactccacce tgtaccatc
4021 atgcccactg caggcacaac tccagatgaa gactatgaat atatgaatcg gcaacgagat
4081 ggaggtggtc ctgggggtga ttatgcagcc atgggggcct gccagcatc tgagcaaggg
4141 tatgaagaga tgagagcttt tcaggggcct ggacatcagg ccccccattg ccattatgcc
4201 cgccataaaa ctctacgtag cttagaggct acagactctg cctttgataa ccctgattac
4261 tggcatagca ggcttttccc caaggctaata gccagagaa cgtaactcct gctccctgtg
4321 gcactcaggg agcatttaata ggcagctagt gccttttagag ggtaccgtct tctccctatt
4381 ccctctctct cccaggctccc agcccttttt ccccgctccc agacaattcc attcaatctt
4441 tggaggcttt taaacatttt gacacaaaat tcttatggta tgtagccagc tgtgcacttt
4501 cttctctttc ccaaccccag gaaagggttt ccttattttg tgtgctttcc cagtcccatt
4561 cctcagcttc ttcacaggca ctcttgagga tatgaaggat tactctccat atcccttctt
4621 ctcaggctct tgactacttg gaactaggct cttatgtgtg cctttgtttc ccatcagact
4681 gtcaagaaga ggaaaggag gaaacctagc agaggaaagt gtaatttttg tttatgactc
4741 ttaaccccct agaaagacag aagcttaaaa tctgtgaaga aagagggttag gagtagatat
4801 tgattactat cataattcag cacttaacta tgagccaggc atcactacta acttcaccta
4861 cattatctca cttagtcttt tatcatcctt aaaacaattc tgtgacatac atattatctc
4921 attttacaca aagggaagtc gggcatggtg gctcatgcct gtaatctcag cactttggga
4981 ggctgaggca gaaggattac ctgaggcaag gagtttgaga ccagcttagc caacatagta
5041 agacccccat ctctttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaactttag aactgggtgc
5101 agtggctcat gcctgtaatc ccagccagca ctttgggagg ctgagatggg aagatcactt
5161 gagcccagaa ttagagataa gcctatggaa acatagcaag aactgtctc tacaggggaa
5221 aaaaaaaaaa gaaactgagc cttaaagaga tgaaataaat taagcagtag atccaggatg
5281 caaaatcctc ccaattcctg tgcattgtgt cttattgtaa ggtgccaaag aaaactgatt
5341 taagttacag cccttgttta aggggcactg tttcttgttt ttgactgaa tcaagtctaa
5401 ccccaacagc cacatcctcc tatacctaga catctcatct caggaagtgg tgggtgggggt
5461 agtcagaagg aaaaataact ggacatcttt gtgtaaacca taatccacat gtgccgtaaa
5521 tgatcttcac tccttatccg agggcaaat cacaaggatc ccaagatcc acttttagaa
5581 gccattctca tccagcagtg agaagcttcc aggtaggaca gaaaaaagat ccagcttcag
5641 ctgcacacct ctgtcccttt ggatggggaa ctaagggaaa acgtctgttg tatcactgaa
5701 gttttttgtt ttgtttttat acgtgtctga ataaaaatgc caaagttttt tttcagcaaa
5761 aaaaa

```

Fig. 3

```

1  mrandalqvl  gllfslargs  evgnsqavcp  gtlnqlsvtg  daenqyqtly  klyercevwm
61  gnleivltgh  nadlsflqwi  revtgyvlva  mnefstlplp  nlrvvrgtqv  ydgkfaifvm
121 lnyntnssha  lrqlrltqlt  eilsggyvie  kndklchmdt  idwrdivrdr  daeivvkdnq
181 rscppchevc  kgrcwpggse  dcqtltktic  apqcnghcfg  pnpnqcchde  caggcsgpqd
241 tdcfacrhfn  dsgacvprcp  qplvynkltf  qlepnphtky  qyggvcvasc  phnfvvdqts
301 cvracppdkm  evdknglkmc  epcggglcpk  cegtsgsgrf  qtdssnidg  fvnctkilgn
361 ldflitglnq  dpwhkipald  peklnvfrtv  reitgylmq  swpphmnfs  vfsnlttigg
421 rslynrgfsl  limknlvts  lgfrslkeis  agriyisanr  qlcyhslnw  tkvlrgptee
481 rldikhnrpr  rdcvaegkvc  dplcssggcw  gpgpgqclsc  rnysrggvcv  thcnflngep
541 refaheaecf  schpecqpme  gtatcngsgs  dtcaqcahfr  dgphcvsscp  hgvlgakgpi
601 ykypdvq nec  rpchenctqg  ckgpelqdc  gqtlvligkt  hltmaltvia  glvvifmmlg
661 gtflywrgrr  iqnkramrry  lergesiepl  dpsekankvl  arifketelr  klkvlsgsvf
721 gtvhkgvwip  egesikipvc  ikviedksgr  qsfqavtdhm  laigsldhah  ivrllglcpg
781 sslqlvtqyl  plgslldhvr  qhrgalgpql  llnwgvqiak  gmyyleehgm  vhrnlaarnv
841 llkspsqvqv  adfgvadllp  pddkqllyse  aktpikwmal  esihfgkyth  qsdvwsygv
901 vwelmtfgae  pyaglr laev  pdllekgerl  aqpqictidv  ymvmvkcwmi  denirptfke
961 laneftmar  dpprylvikr  esgpgiapgp  ephgltnkkl  eevelepeld  ldldleaeed
1021 nlatttlgsa  lslpvgtlnr  prgsqslsp  ssgympmngg  nlgescques  vsgssercpr
1081 pvsllhpmprg  classessegh  vtgseaelqe  kvsmcrsr  srsprprgds  ayhsqrhsl
1141 tpvtplspg  leeedvngyv  mpdthlkgtp  ssregtlssv  glssvlgte  ededeeyeym
1201 nrrrrhspph  pprpssleel  gyeymdvgsd  lsaslgstqs  cplhpvpimp  tagttdedy
1261 eymnrqrdgg  gpqgdyaamg  acpaseqgye  emrafqpggh  qaphvhyarl  ktlrsleatd
1321 safdnpywh  srlfpkanaq  rt

```

Fig. 4

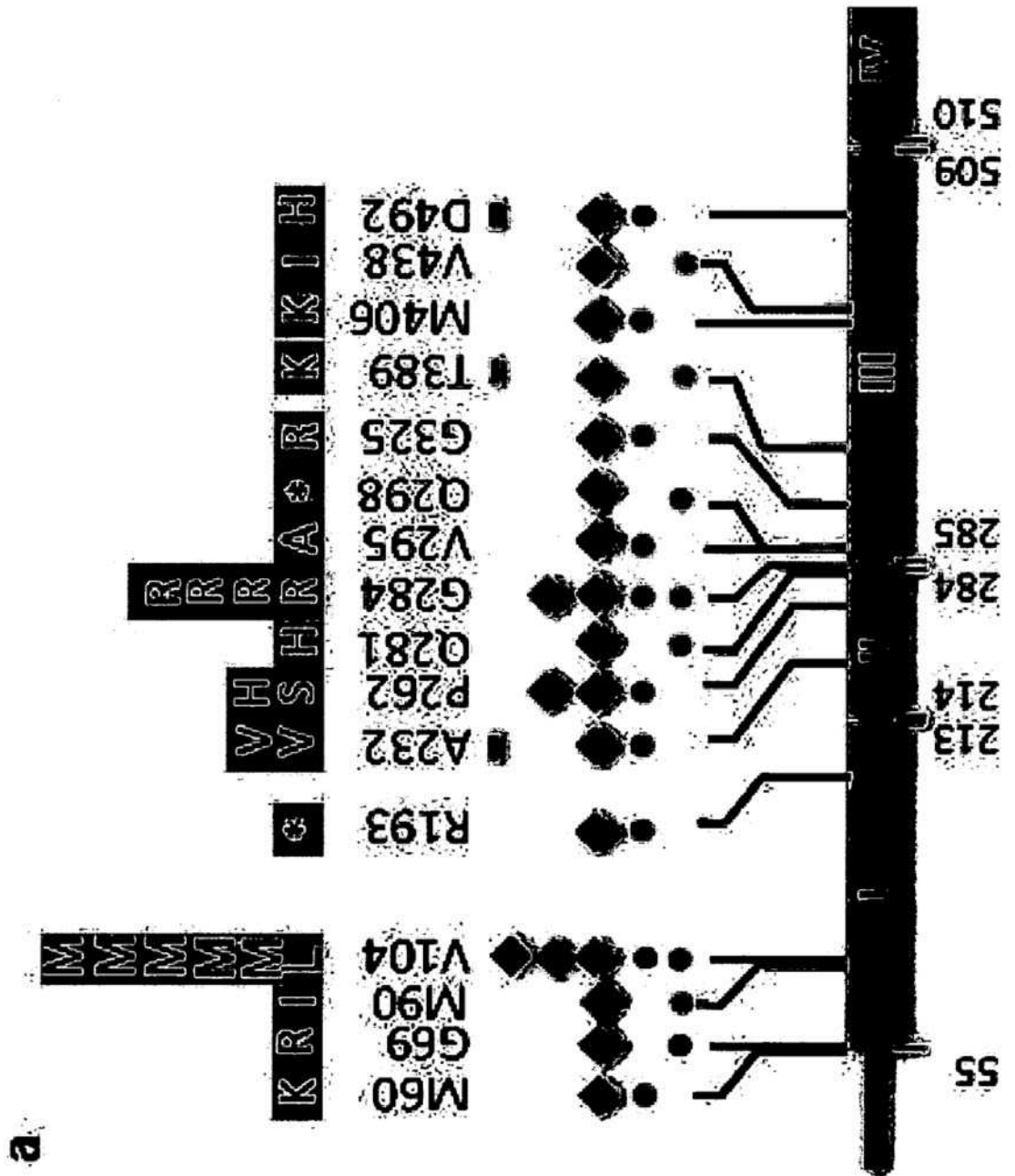


Fig.4 (continuação)

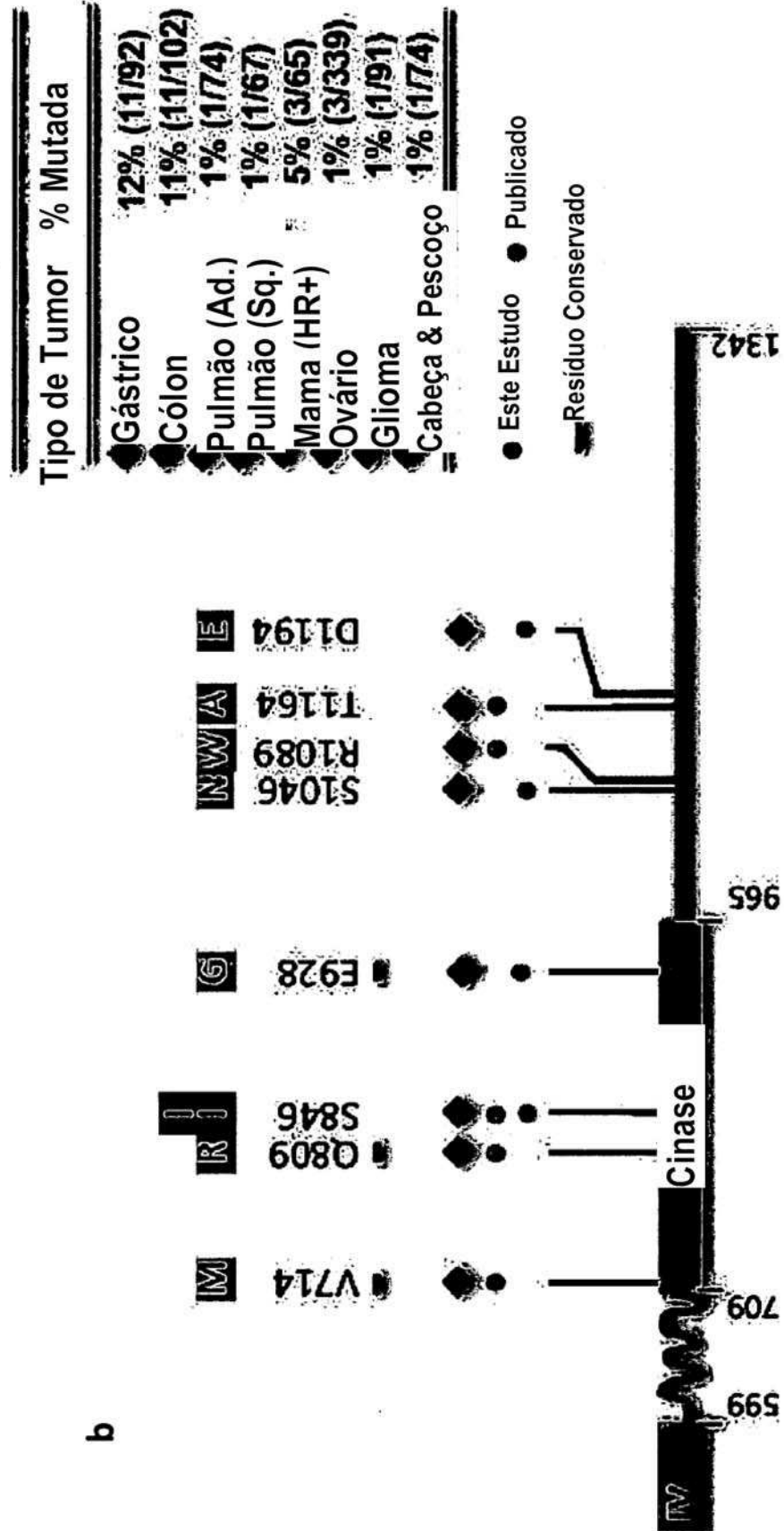


Fig.4 (continuação)

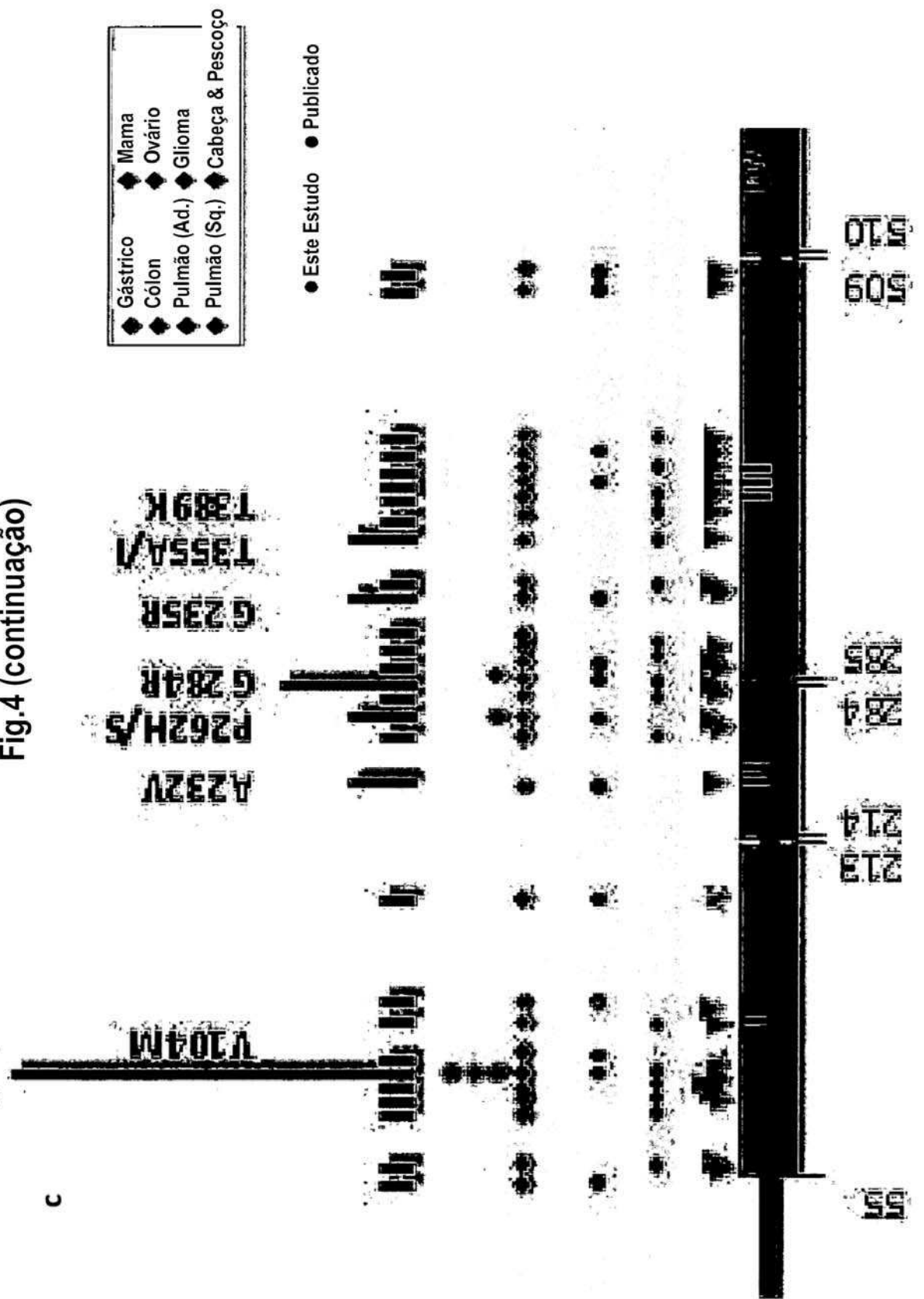
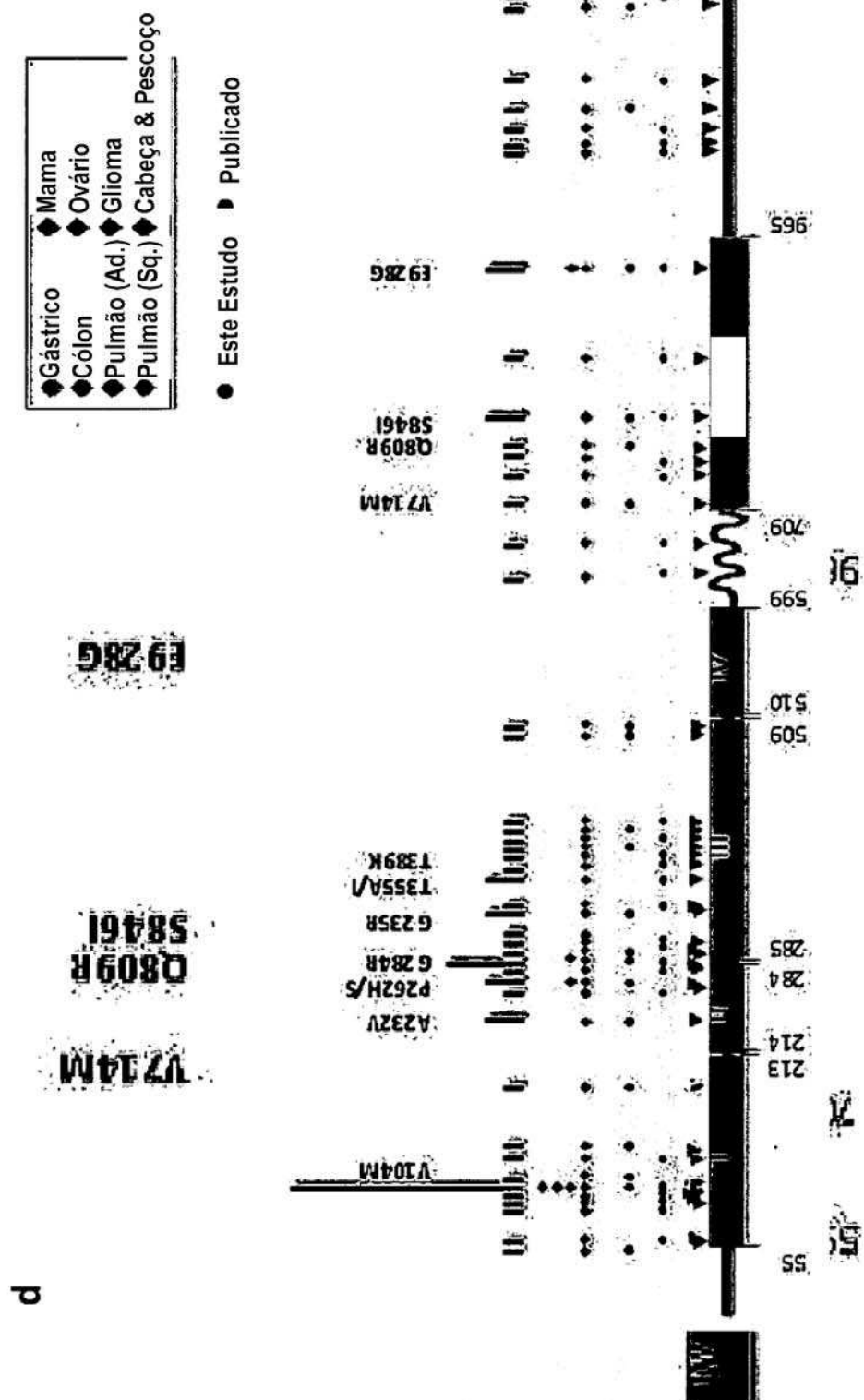


Fig.4 (continuação)



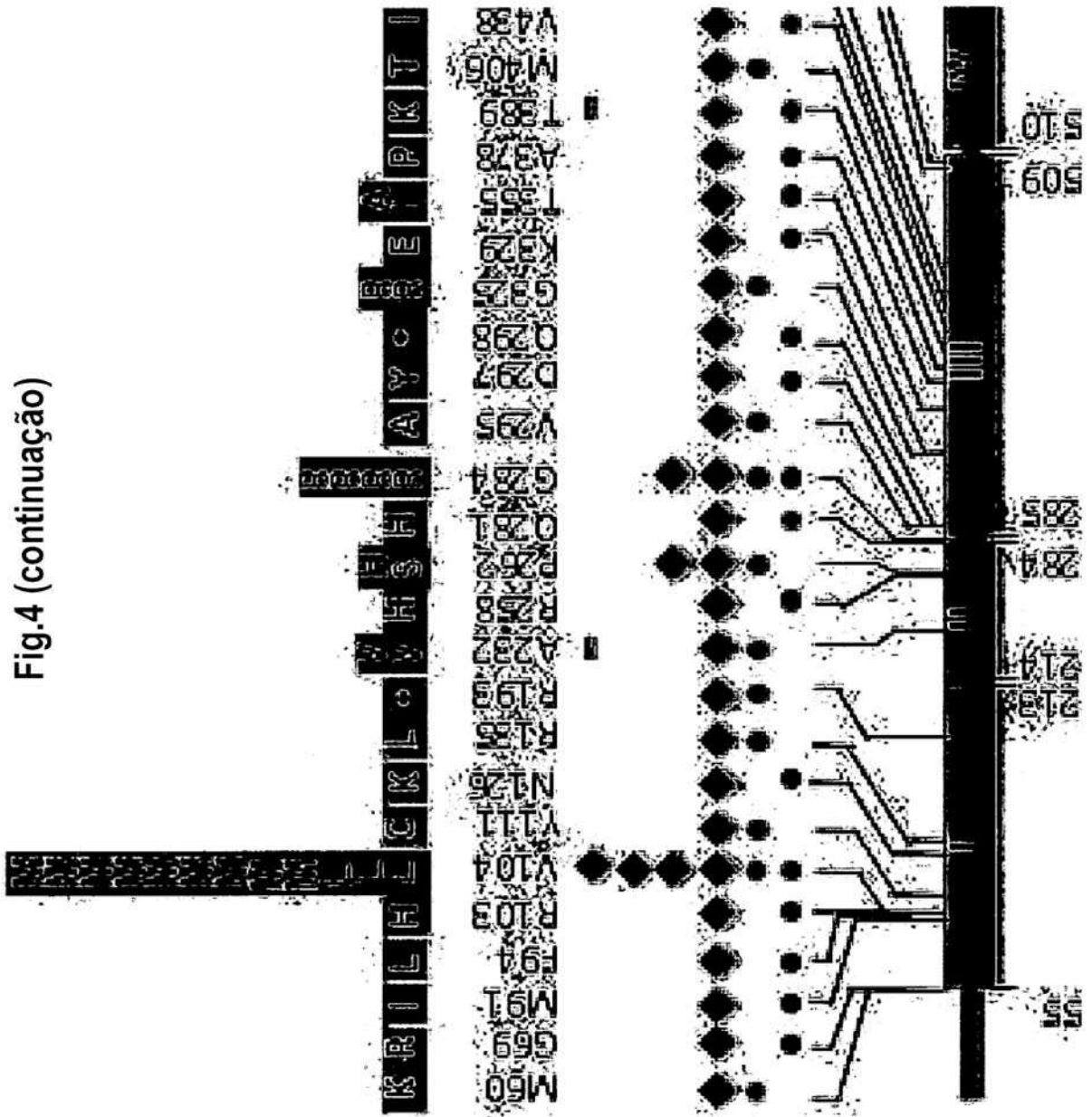


Fig.4 (continuação)

f

Tipo de Tumor	% Mutada
◆ Gástrico	12% (11/92)
◆ Colón	11% (11/102)
◆ Pulmão (Ad.)	1% (1/74)
◆ Pulmão (Sd.)	1% (1/67)
◆ Mama (HR+)	4% (6/144)
◆ Ovário	1% (3/339)
◆ Glioma	1% (1/91)
◆ Cabeça & Pescoço	1% (1/74)

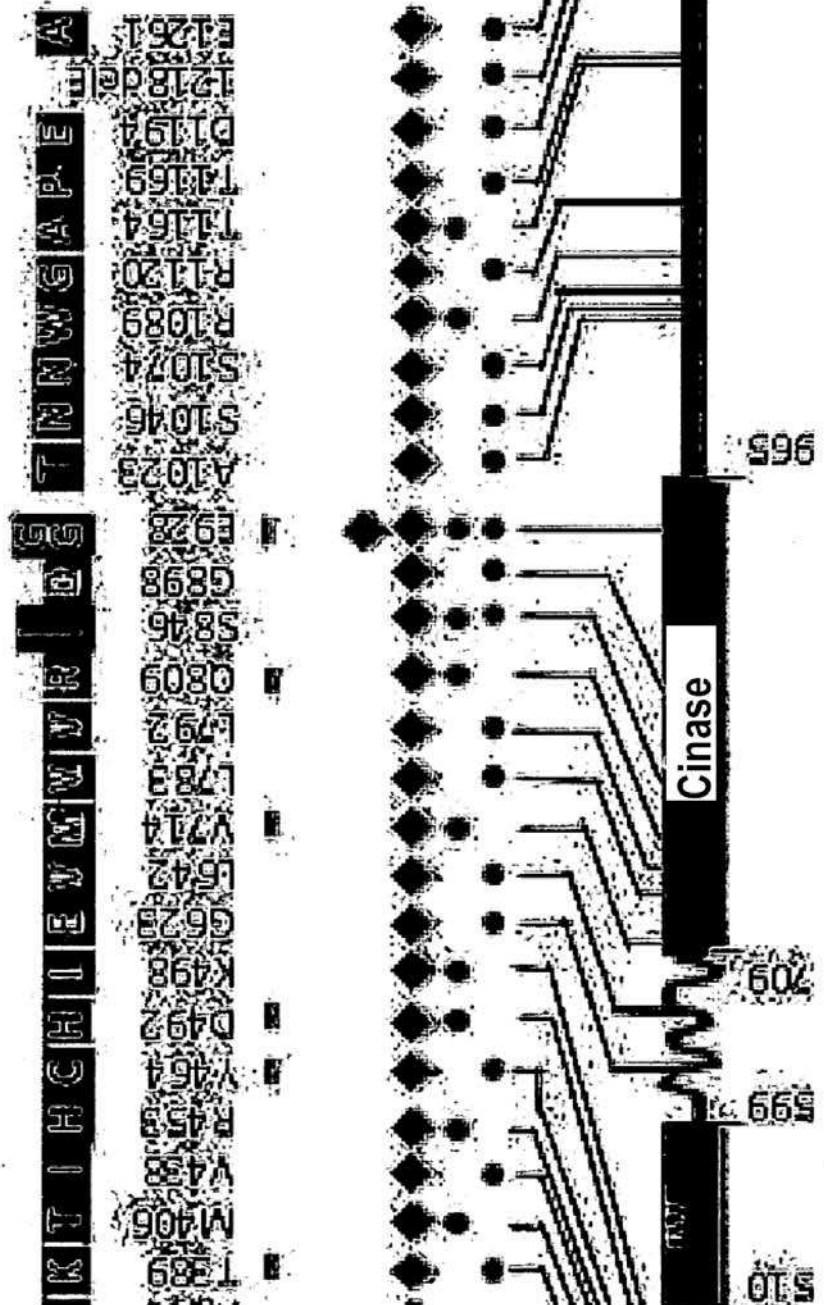


Fig. 5

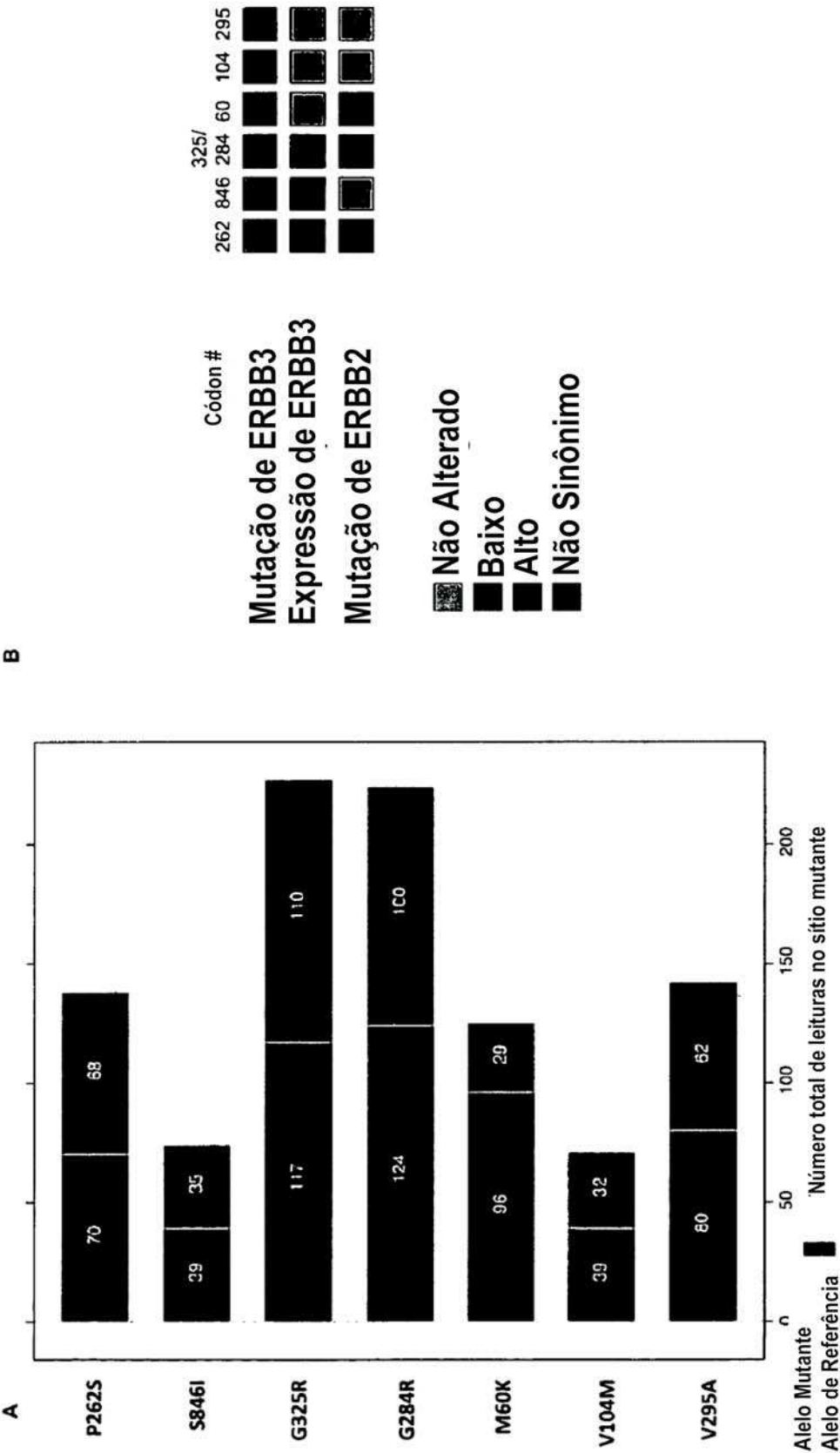


Fig. 6

NP_001973.2	AKALQVLGLFSLAQS	YLYLEGEVWGNLEI VLTG	PNLWVGTQVYGCFAIF
NP_034283.1	SAI GTLQVLGLFSLAQS	YLYLEGEVWGNLEI VLTG	PNLWVGTQVYGCFAIF
NP_058914.2	ATGTLQVLGLFSLAQS	YLYLEGEVWGNLEI VLTG	PNLWVGTQVYGCFAIF
NP_001096575.1	VI ALQVLGLFSLAQS	YLYLEGEVWGNLEI VLTG	PNLWVGTQVYGCFAIF
XP_509131.2	VI ALQVLGLFSLAQS	YLYLEGEVWGNLEI VLTG	PNLWVGTQVYGCFAIF
NP_001973.2	YV C SEPDG EVG C GSWGPGSE	GNPNQCE D GAGGCGPC	NFSGAGVP GPQPLV
NP_034283.1	YV CGNEPDG EVG C GSWGPGSE	GNPNQCE D GAGGCGPC	NFSGAGVP GPQPLV
NP_058914.2	YV GALEPDG EVG C GSWGPGSE	GNPNQCE D GAGGCGPC	NFSGAGVP GPQPLV
NP_001096575.1	YV C TEPPG EAG C GSWGPGSE	GNPNQCE D GAGGCGPC	NFSGAGVP GPQPLV
XP_509131.2	YV C SEPDG EVG C GSWGPGSE	GNPNQCE D GAGGCGPC	NFSGAGVP GPQPLV
NP_001973.2	N LTF YQCGGVASCP NFVWQTS	YVFNGLNMEPCGGLCP	A GPVNI PALOP
NP_034283.1	N LTF YQCGGVASCP NFVWQTS	YVFNGLNMEPCGGLCP	A GPVNI PALOP
NP_058914.2	N LTF YQCGGVASCP NFVWQTS	YVFNGLNMEPCGGLCP	A GPVNI PALOP
NP_001096575.1	N LTF YQCGGVASCP NFVWQTS	YVFNGLNMEPCGGLCP	A GPVNI PALOP
XP_509131.2	N LTF YQCGGVASCP NFVWQTS	YVFNGLNMEPCGGLCP	A GPVNI PALOP
NP_001973.2	LNVT IV OSWPP L NFSVFSNLTT CG	LLI L NLMVTSLGFSU GIS	ALNDI KMY
NP_034283.1	LNVT IV OSWPP L NFSVFSNLTT CG	LLI L NLMVTSLGFSU GIS	ALNDI KMY
NP_058914.2	LNVT IV OSWPP L NFSVFSNLTT CG	LLI L NLMVTSLGFSU GIS	ALNDI KMY
NP_001096575.1	LNVT IV OSWPP L NFSVFSNLTT CG	LLI L NLMVTSLGFSU GIS	ALNDI KMY
XP_509131.2	LNVT IV OSWPP L NFSVFSNLTT CG	LLI L NLMVTSLGFSU GIS	ALNDI KMY
NP_001973.2	YDGVAFG VG LANI F ETFL IL VLGSVF	Q I CALGPQLLNMVQ A	VLU SP
NP_034283.1	YDGVAFG VG LANI F ETFL IL VLGSVF	Q I ETFLGPQLLNMVQ A	VLU SP
NP_058914.2	YDGVAFG VG LANI F ETFL IL VLGSVF	Q I ETFLGPQLLNMVQ A	VLU SP
NP_001096575.1	YDGVAFG VG LANI F ETFL IL VLGSVF	Q I CALGPQLLNMVQ A	VLU SP
XP_509131.2	YDGVAFG VG LANI F ETFL IL VLGSVF	Q I CALGPQLLNMVQ A	VLU SP
NP_001973.2	QVQVAFPGVADLLP	VPDLLE GE LAQPC GTI DV	ALSIPVGTLP P GSQSLSP
NP_034283.1	QVQVAFPGVADLLP	VPDLLE GE LAQPC GTI DV	ALSIPVGTLP P GSQSLSP
NP_058914.2	QVQVAFPGVADLLP	VPDLLE GE LAQPC GTI DV	ALSIPVGTLP P GSQSLSP
NP_001096575.1	QVQVAFPGVADLLP	VPDLLE GE LAQPC GTI DV	ALSIPVGTLP P GSQSLSP
XP_509131.2	QVQVAFPGVADLLP	VPDLLE GE LAQPC GTI DV	ALSIPVGTLP P GSQSLSP
NP_001973.2	Y DMP CGLASFSSEC	YVPEI IL GTPSSREGTSSV	EEDEDEEYVYML K GSPP
NP_034283.1	Y DMP CGLASFSSEC	YVPEI IL GTPSSREGTSSV	EEDEDEEYVYML K GSPP
NP_058914.2	Y DMP CGLASFSSEC	YVPEI IL GTPSSREGTSSV	EEDEDEEYVYML K GSPP
NP_001096575.1	Y DMP CGLASFSSEC	YVPEI IL GTPSSREGTSSV	EEDEDEEYVYML K GSPP
XP_509131.2	Y DMP CGLASFSSEC	YVPEI IL GTPSSREGTSSV	EEDEDEEYVYML K GSPP

Fig. 7



Fig. 8

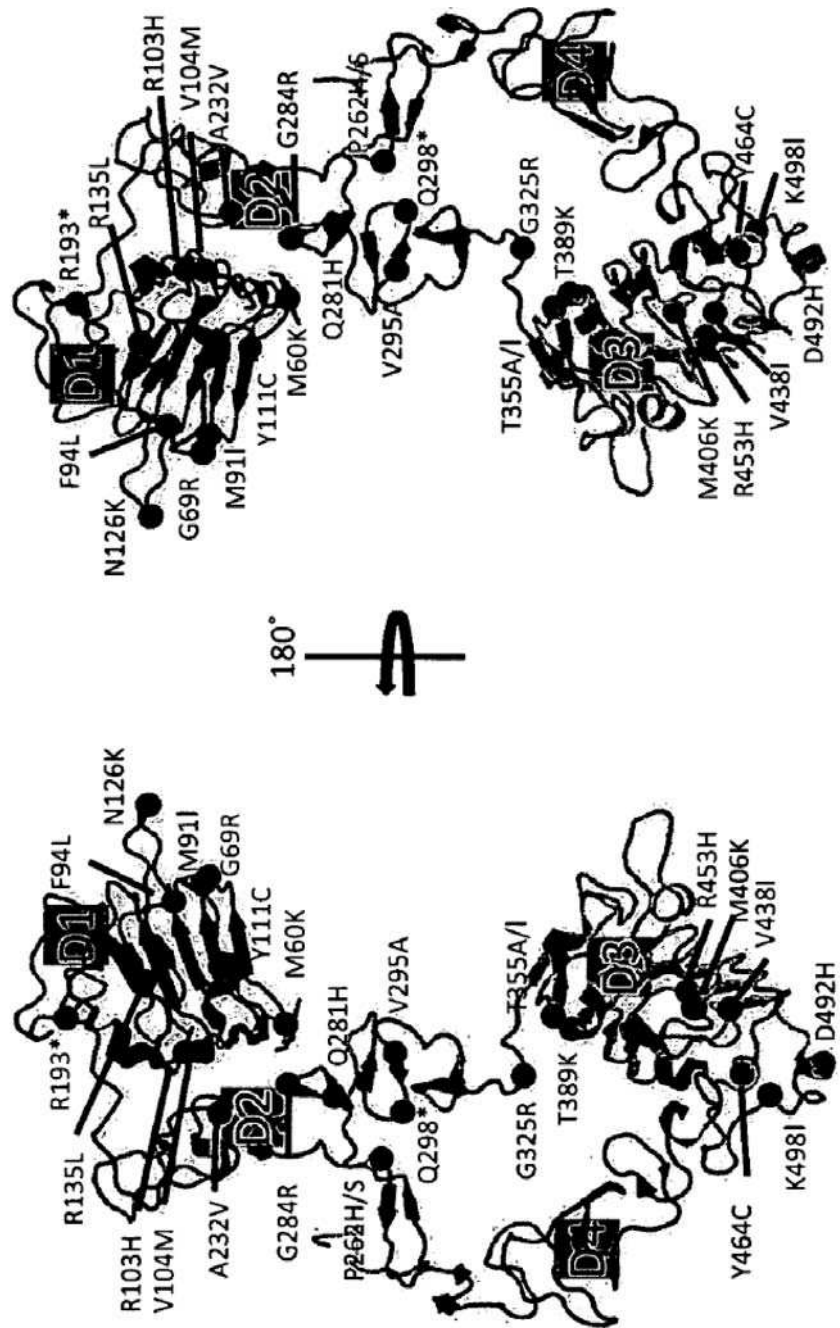


Fig. 9

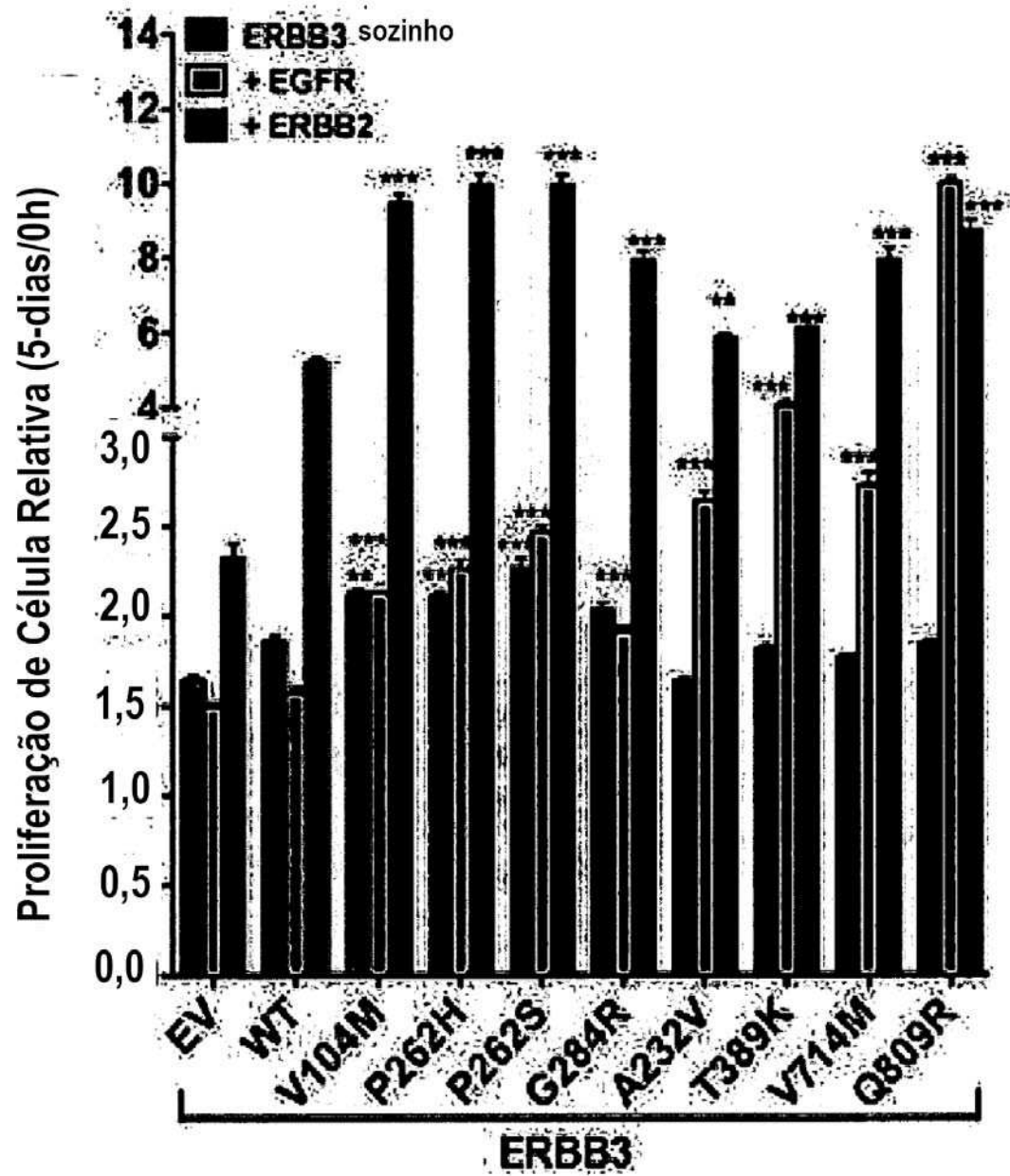


Fig. 10

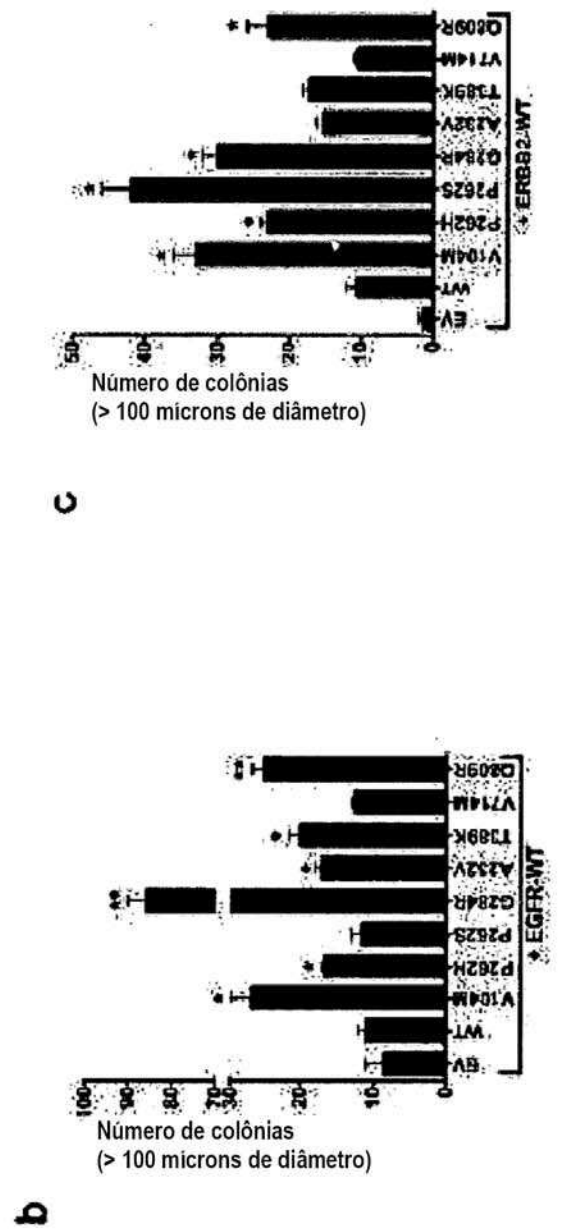
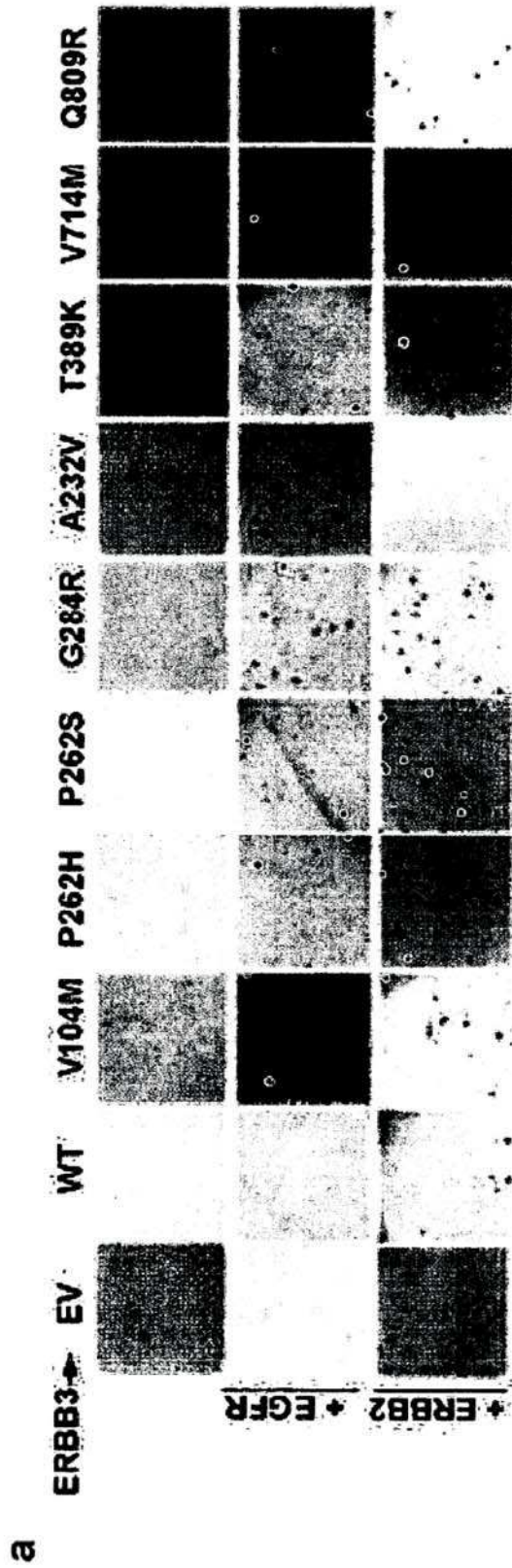


Fig. 11

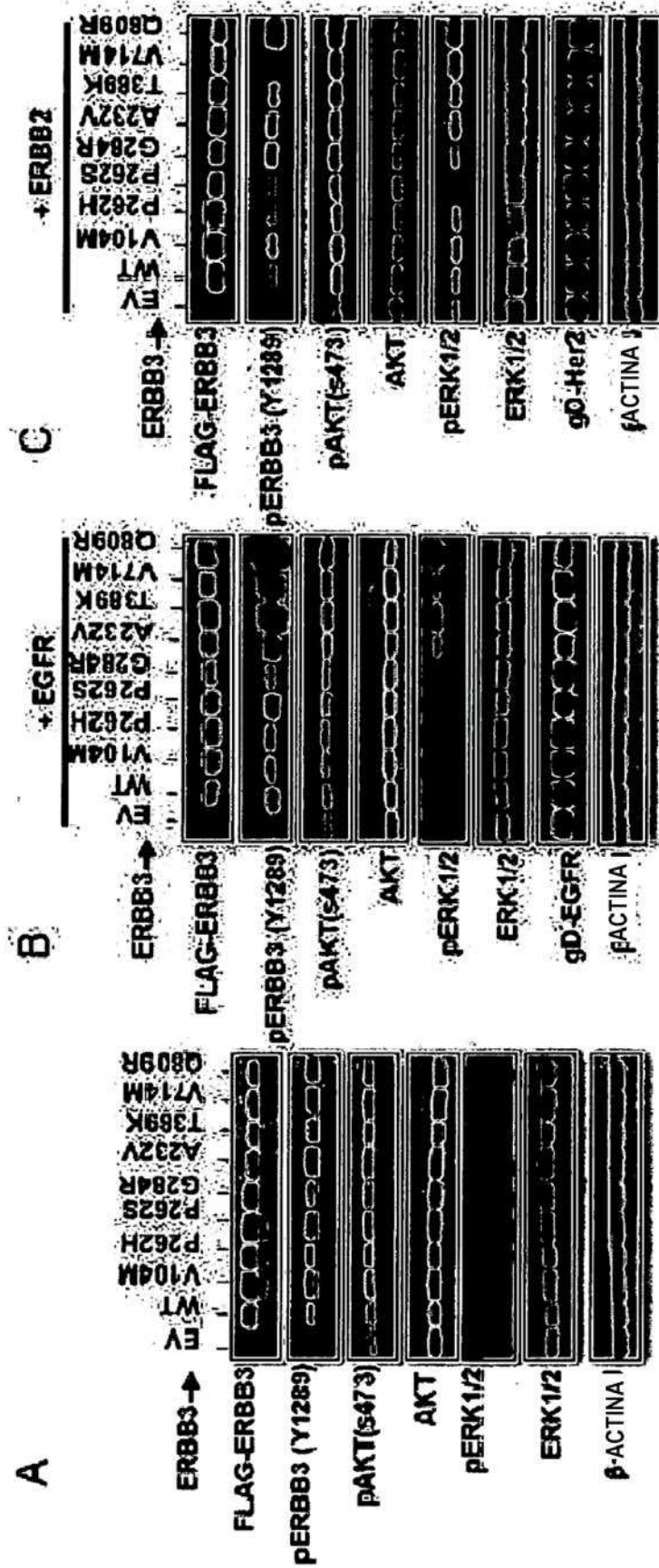


Fig. 12

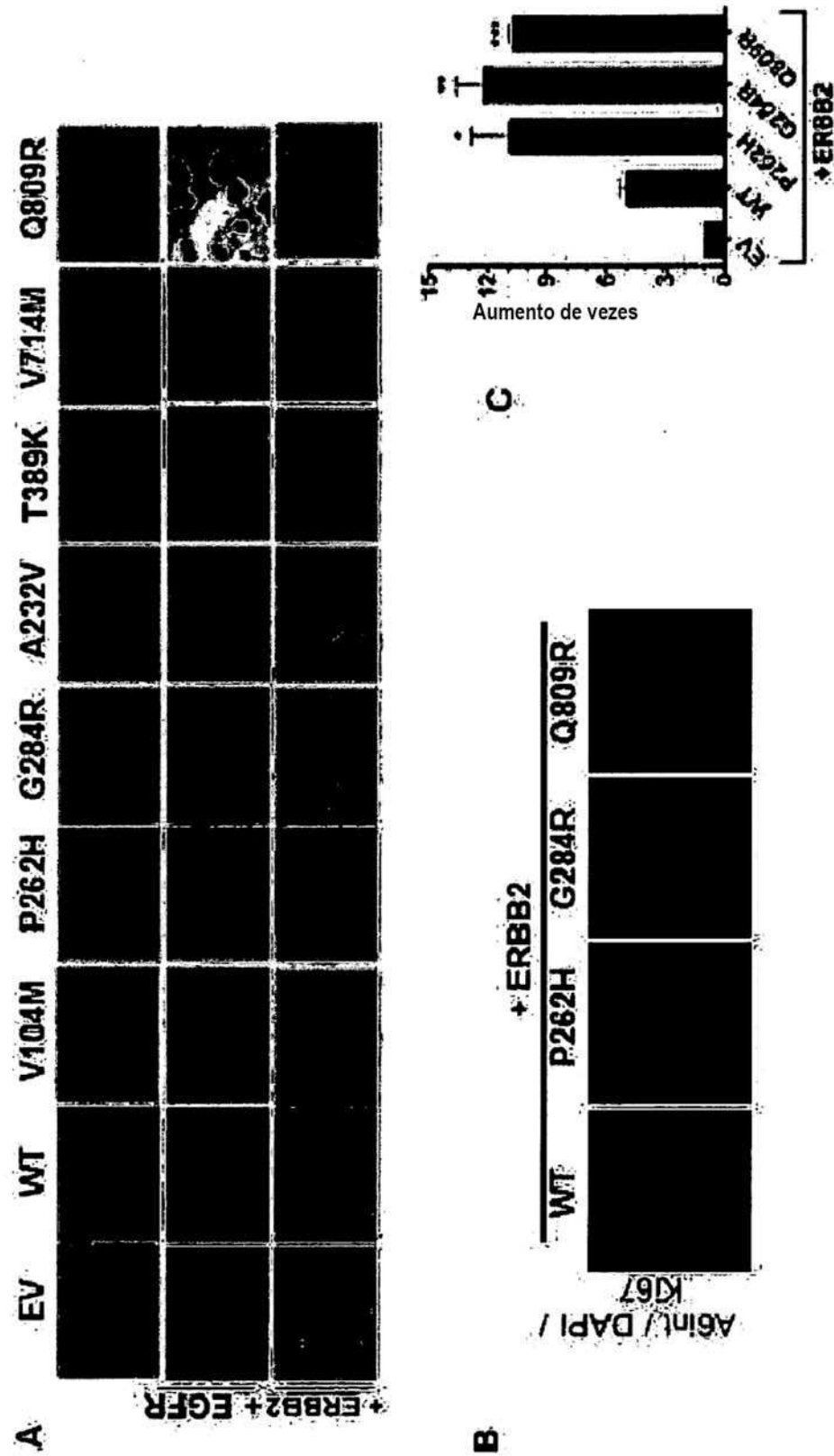


Fig. 13A

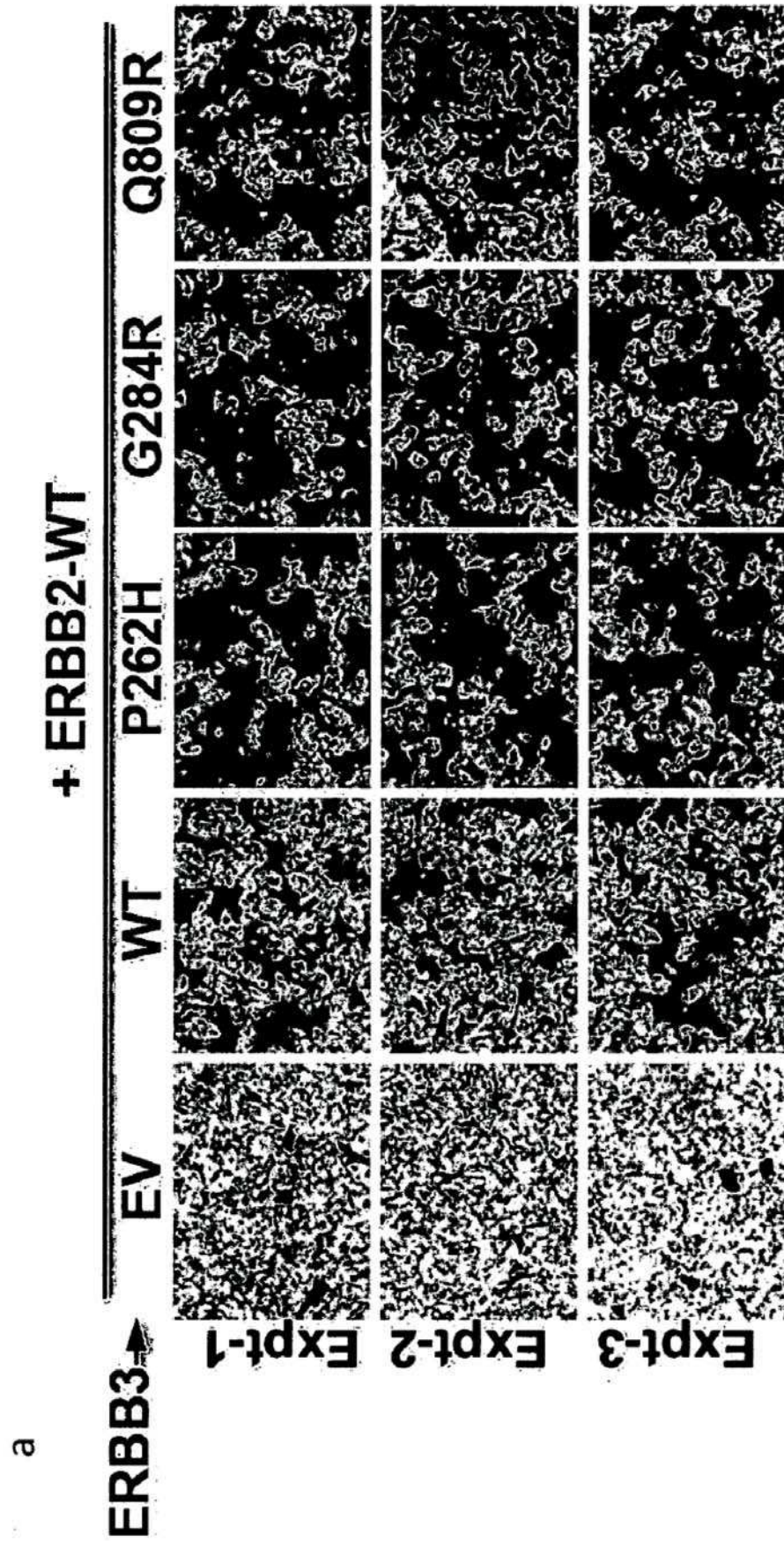
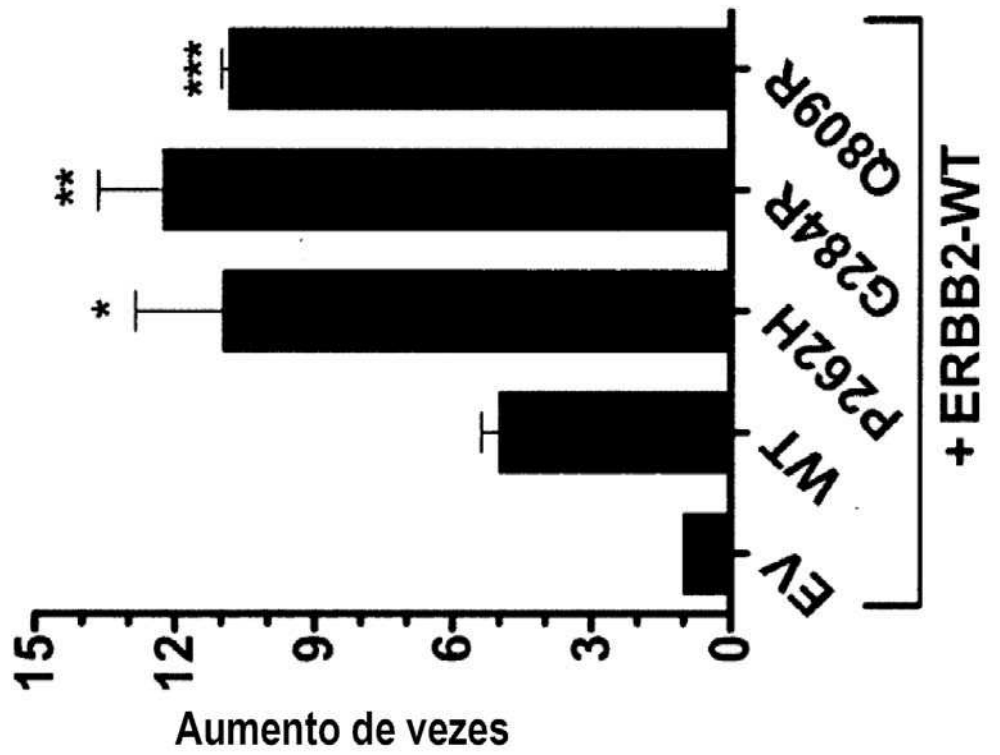


Fig. 13A



b

Fig. 13B

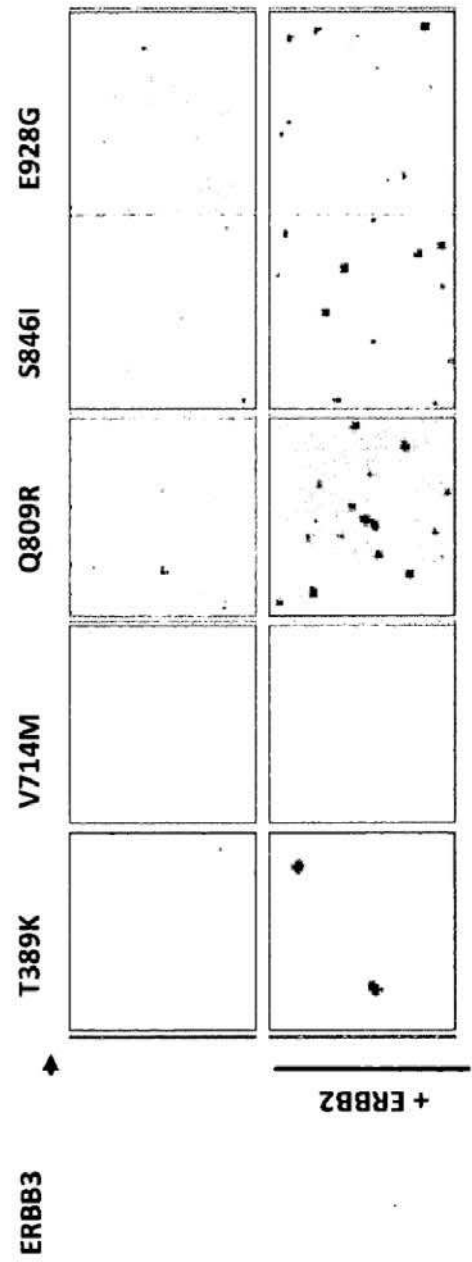
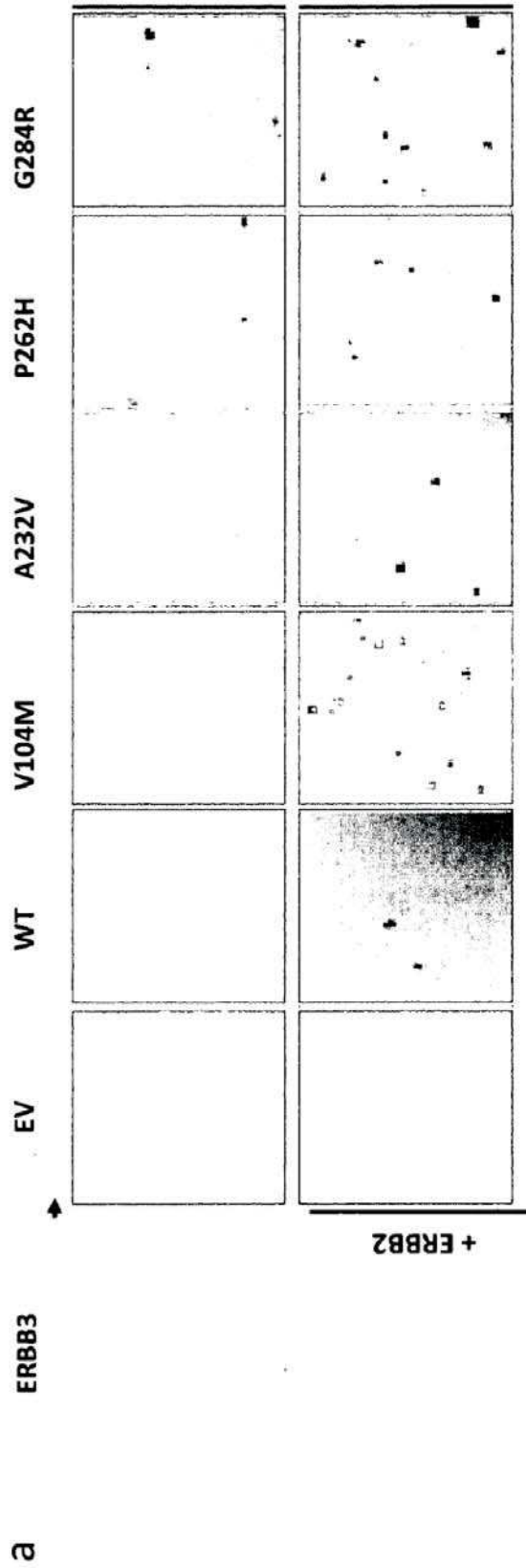
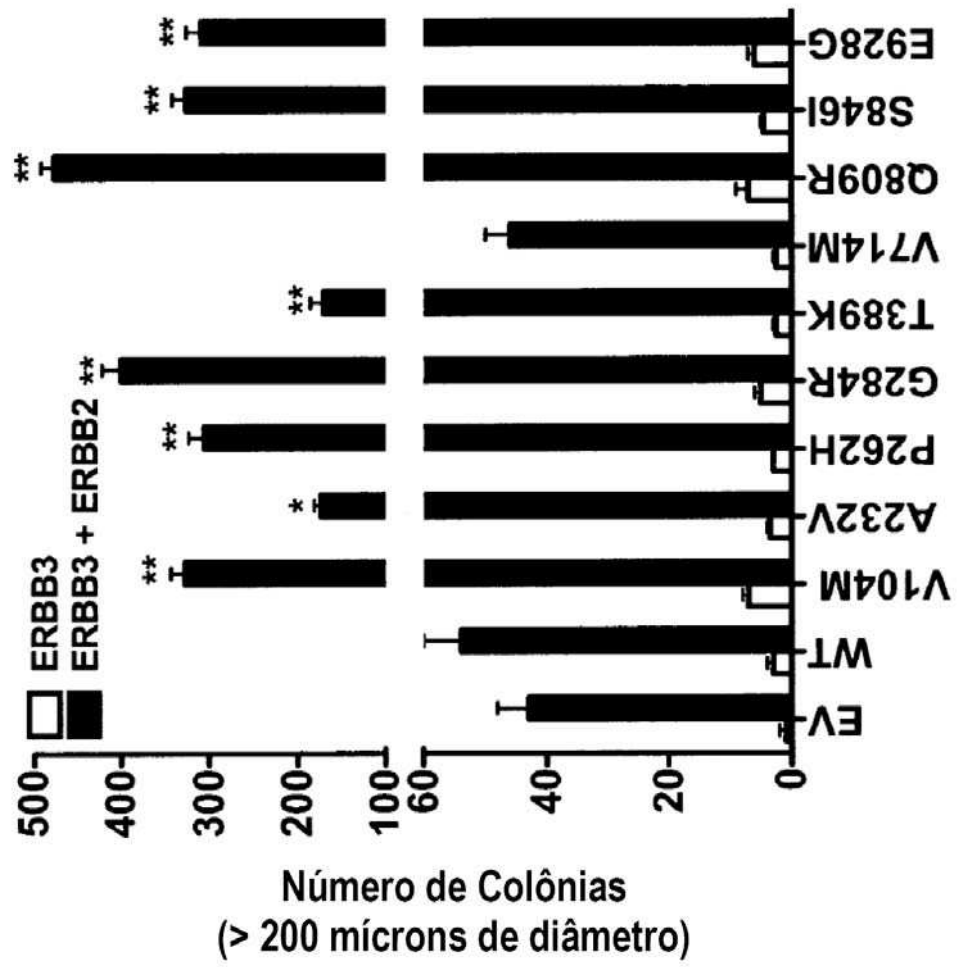


Fig. 13B



b

Fig. 13B

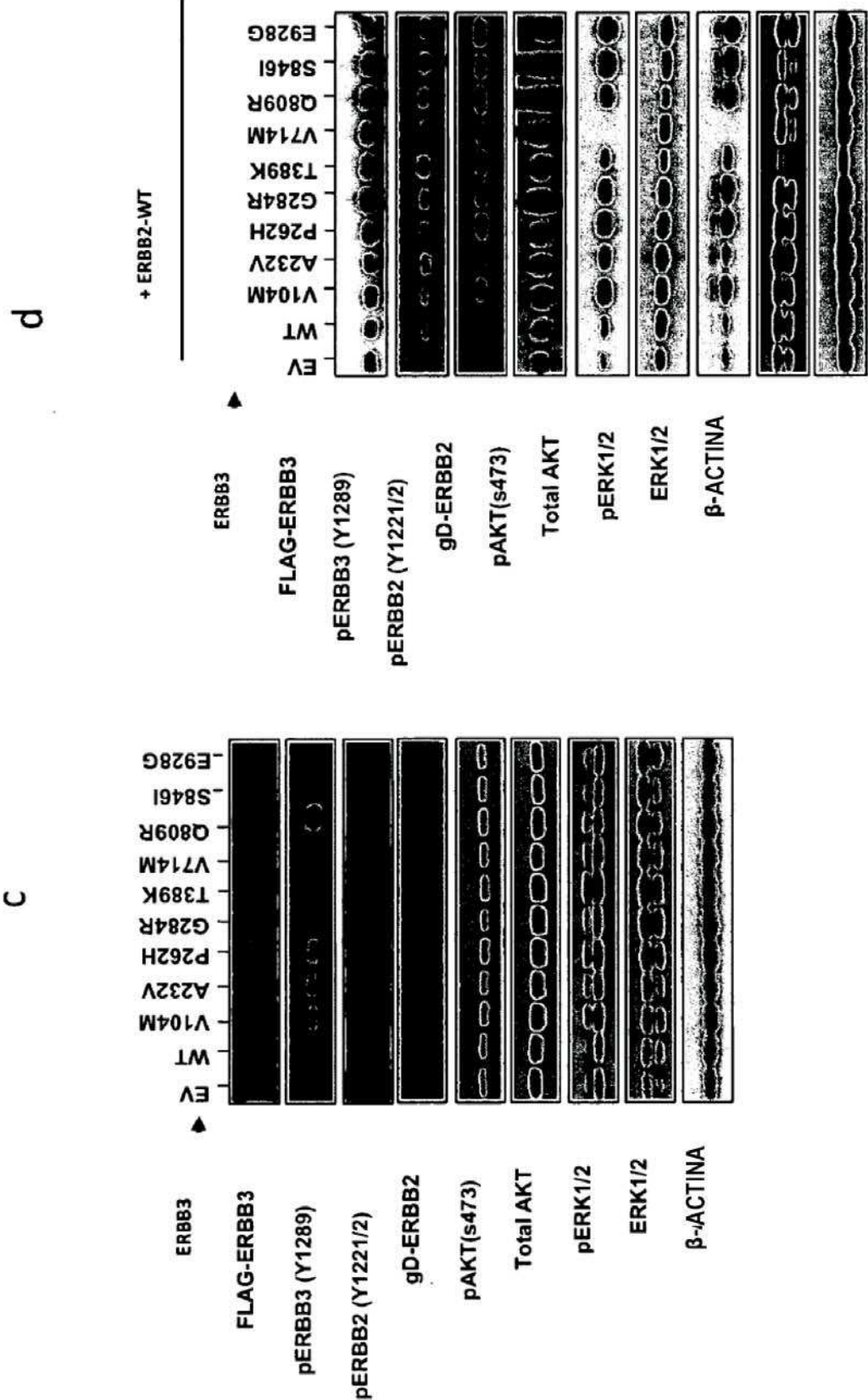
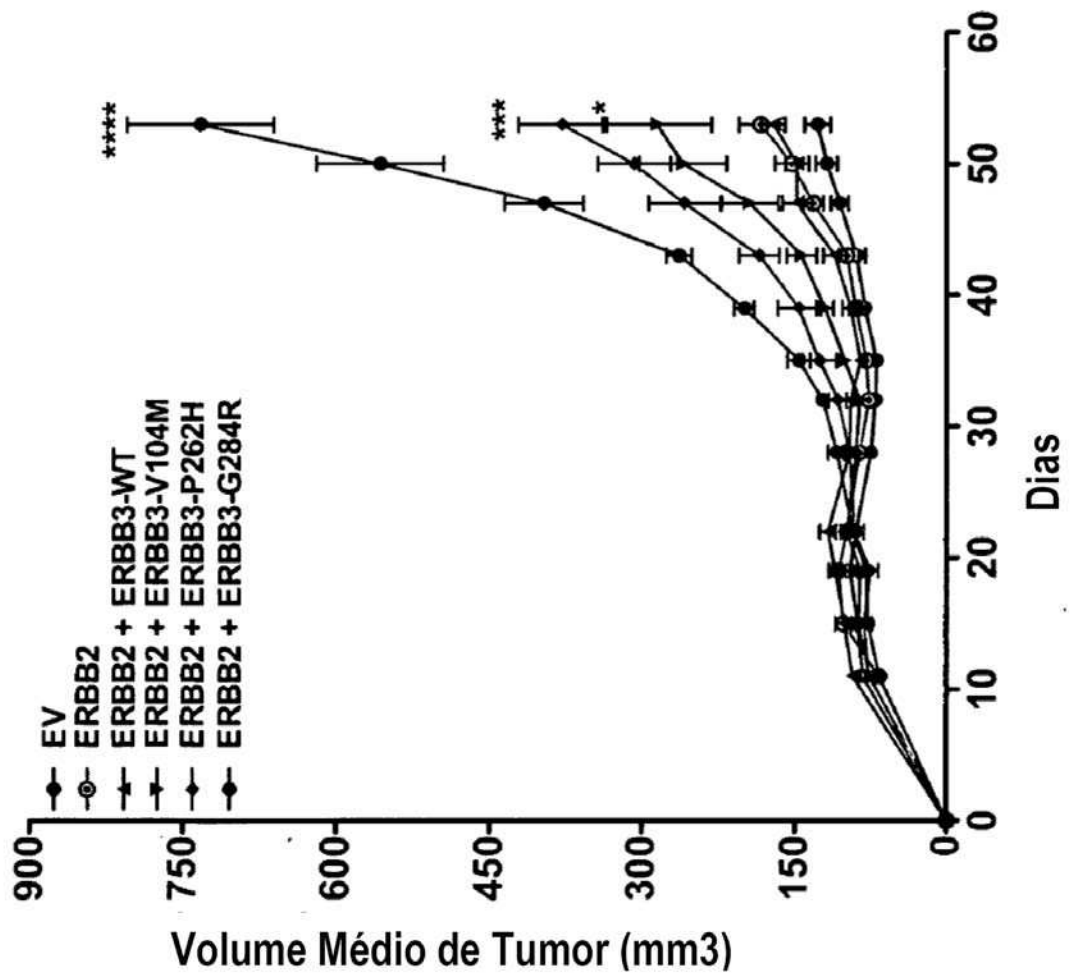


Fig. 13B



e

Fig. 14

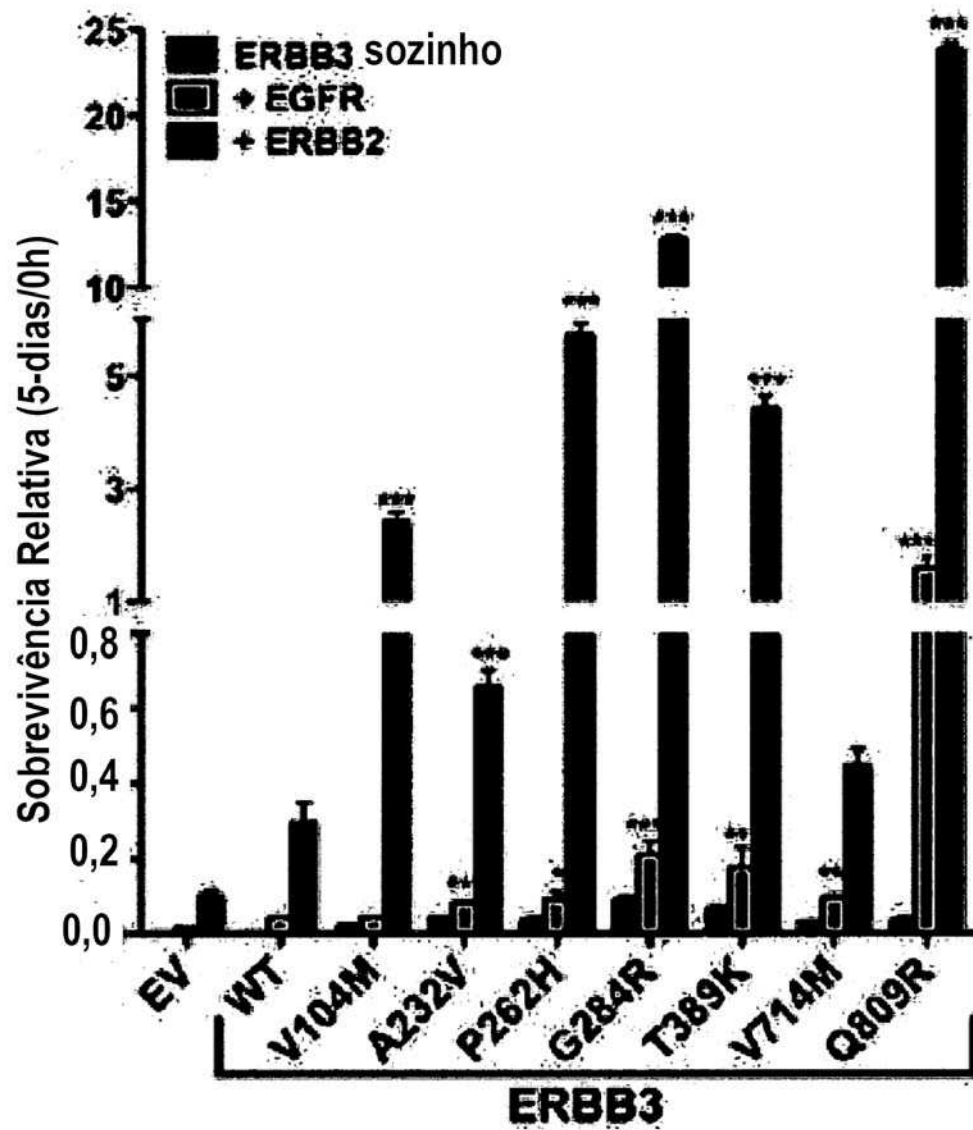


Fig. 15

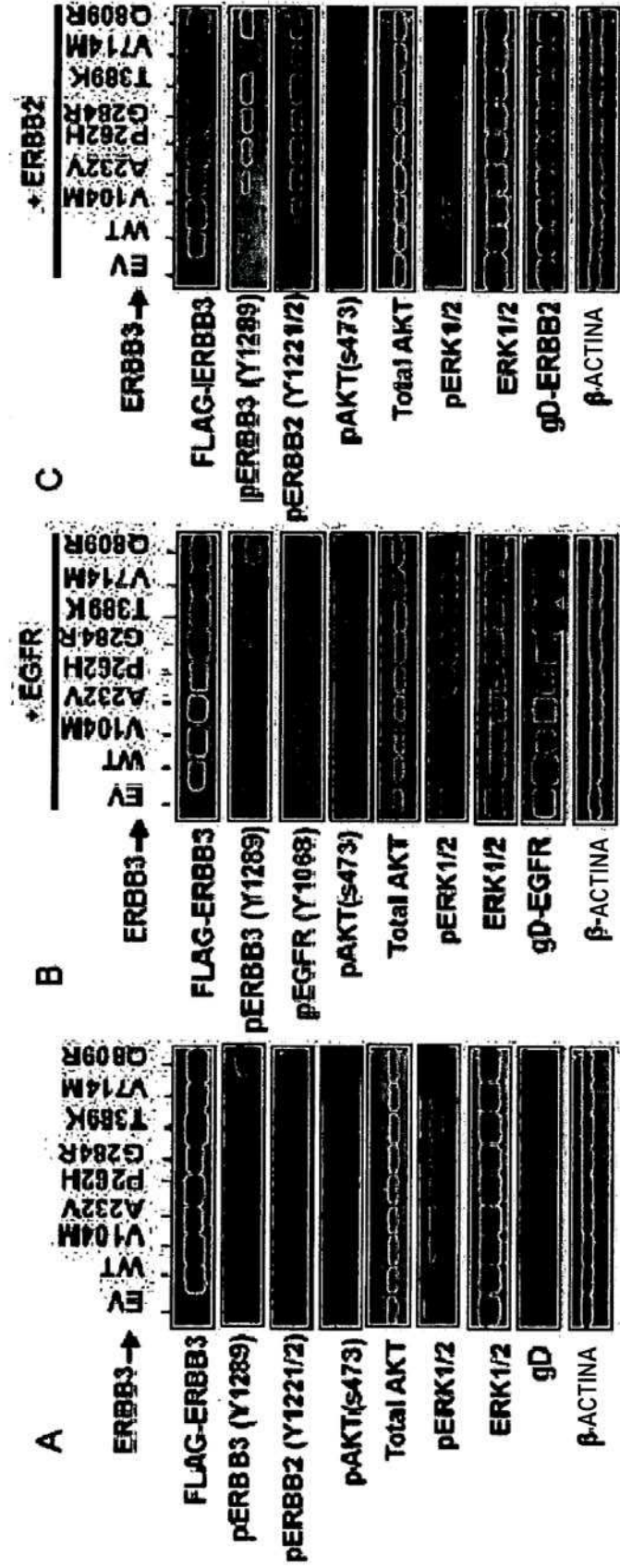


Fig. 16

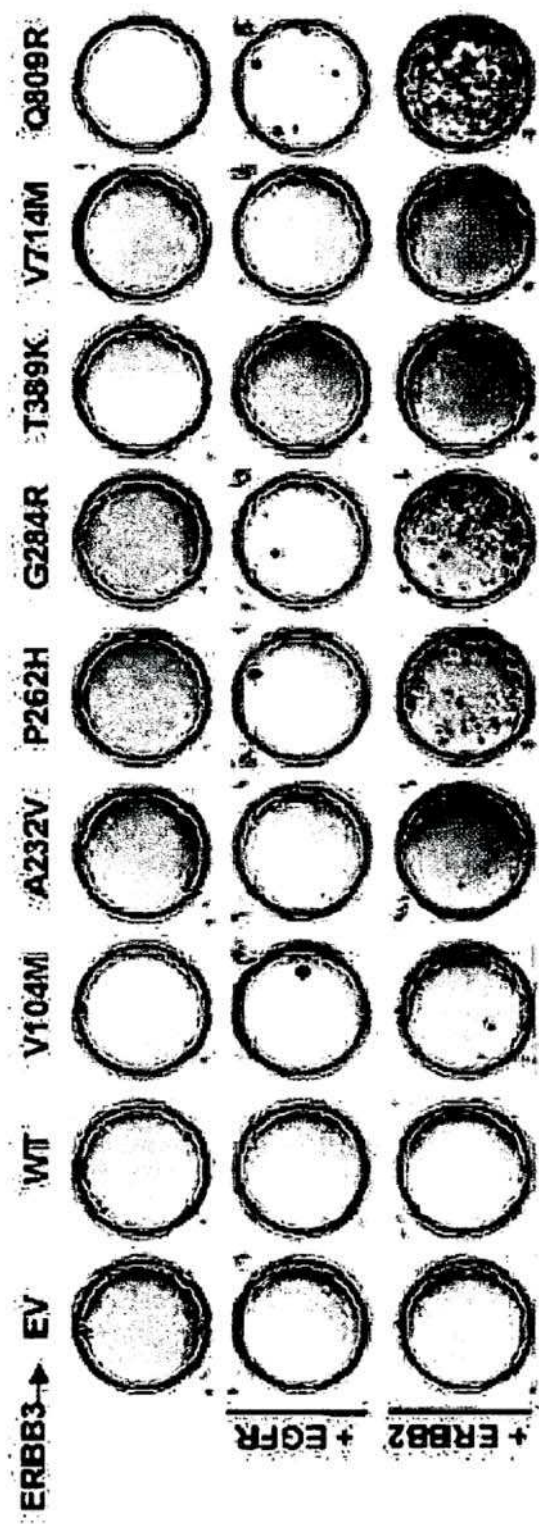


Fig. 17

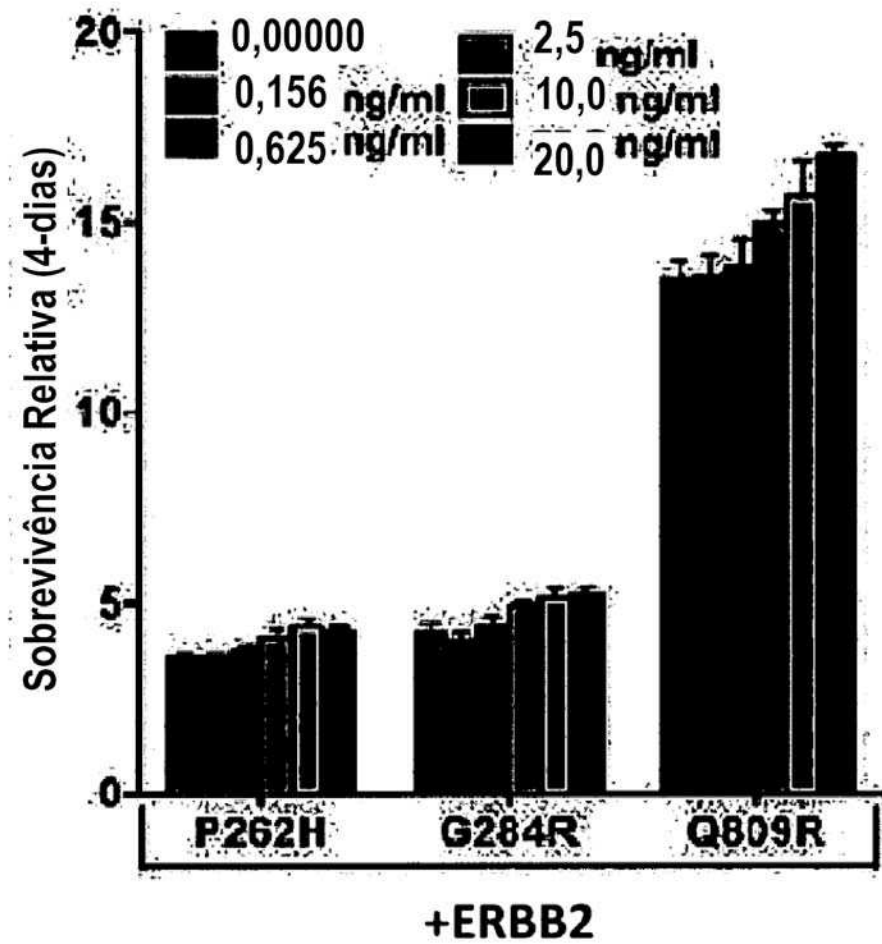


Fig. 18

re

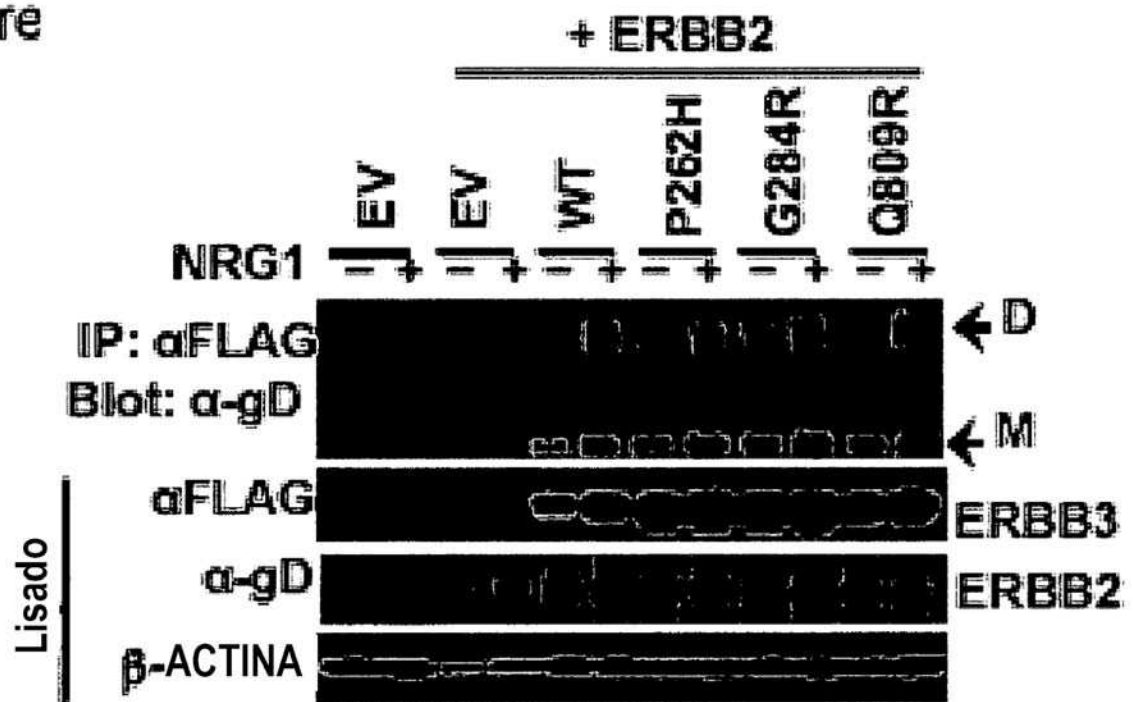


Fig. 19

ERBB3	+ ERBB2				α ERBB2/ α ERBB3	α gD/ α FLAG
	WT	P262H	G284R	Q809R		

Fig. 20

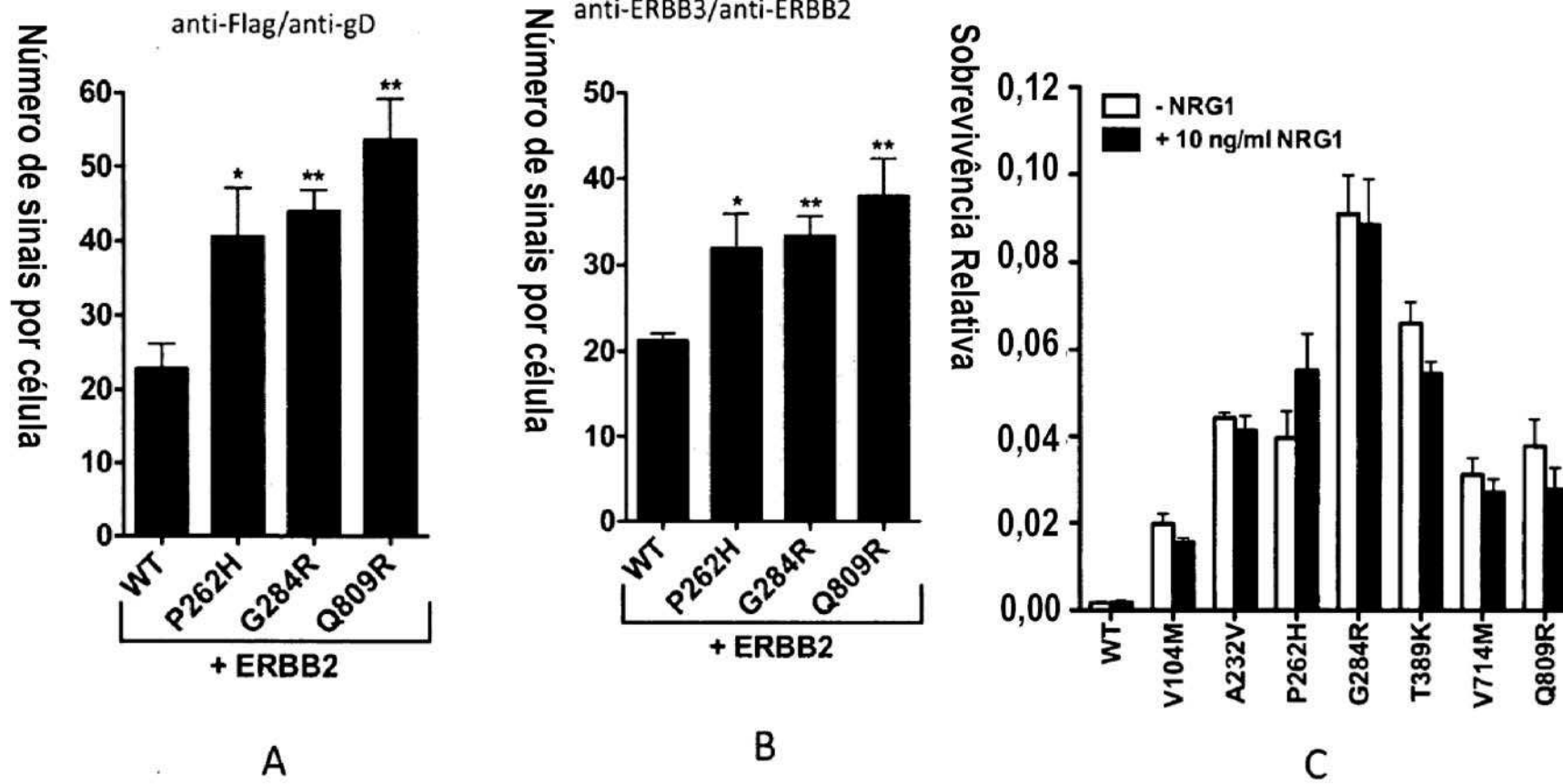


Fig. 21

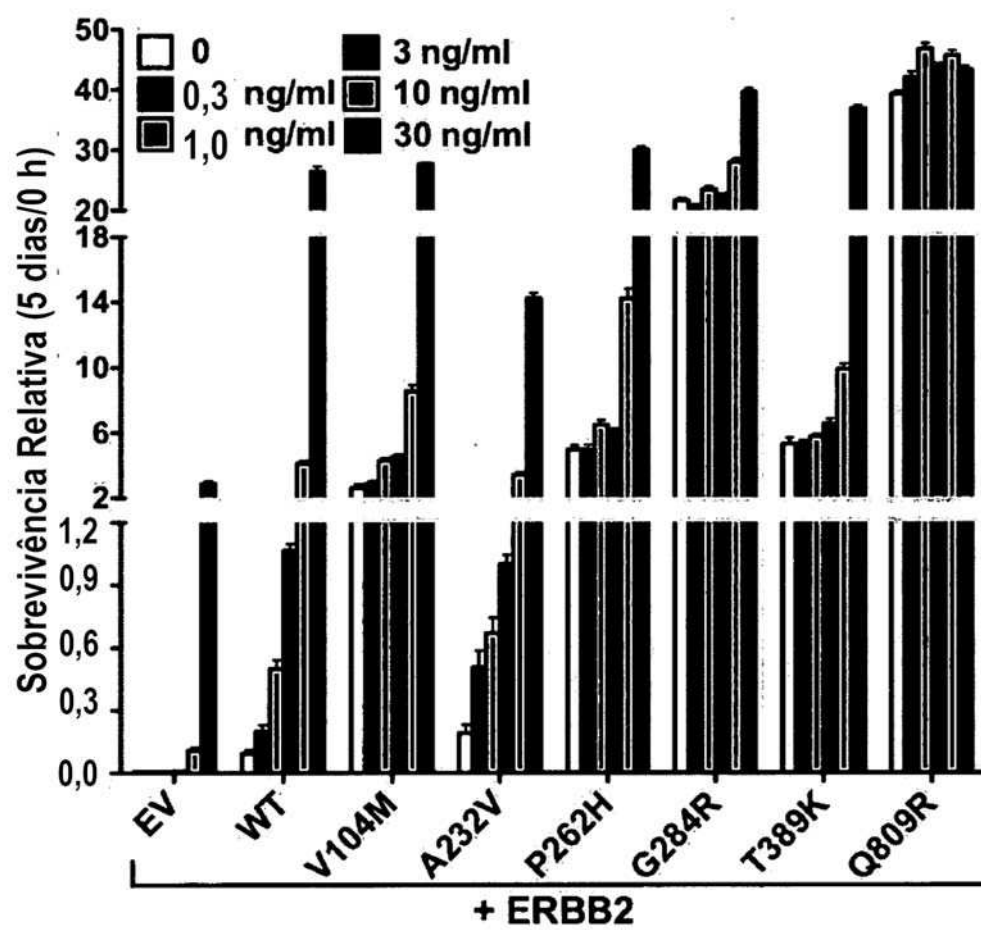


Fig. 22

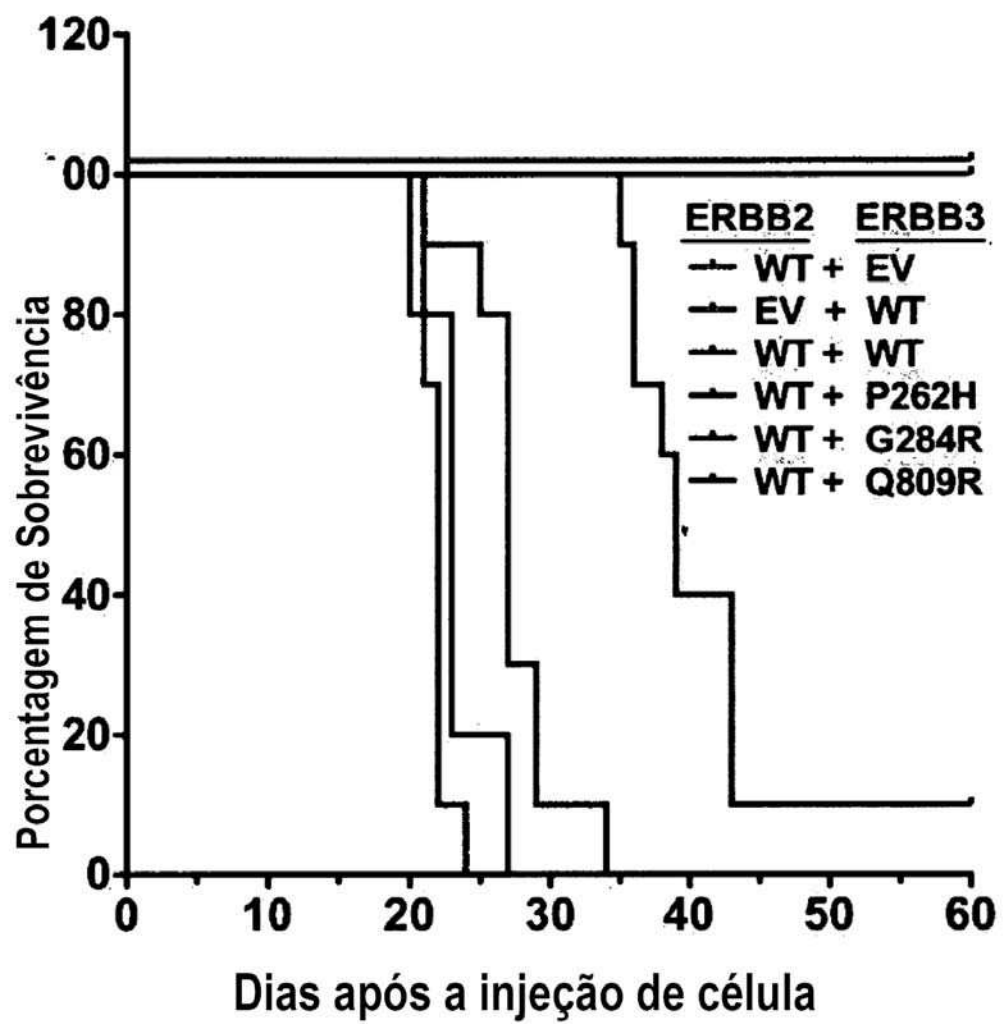


Fig. 23

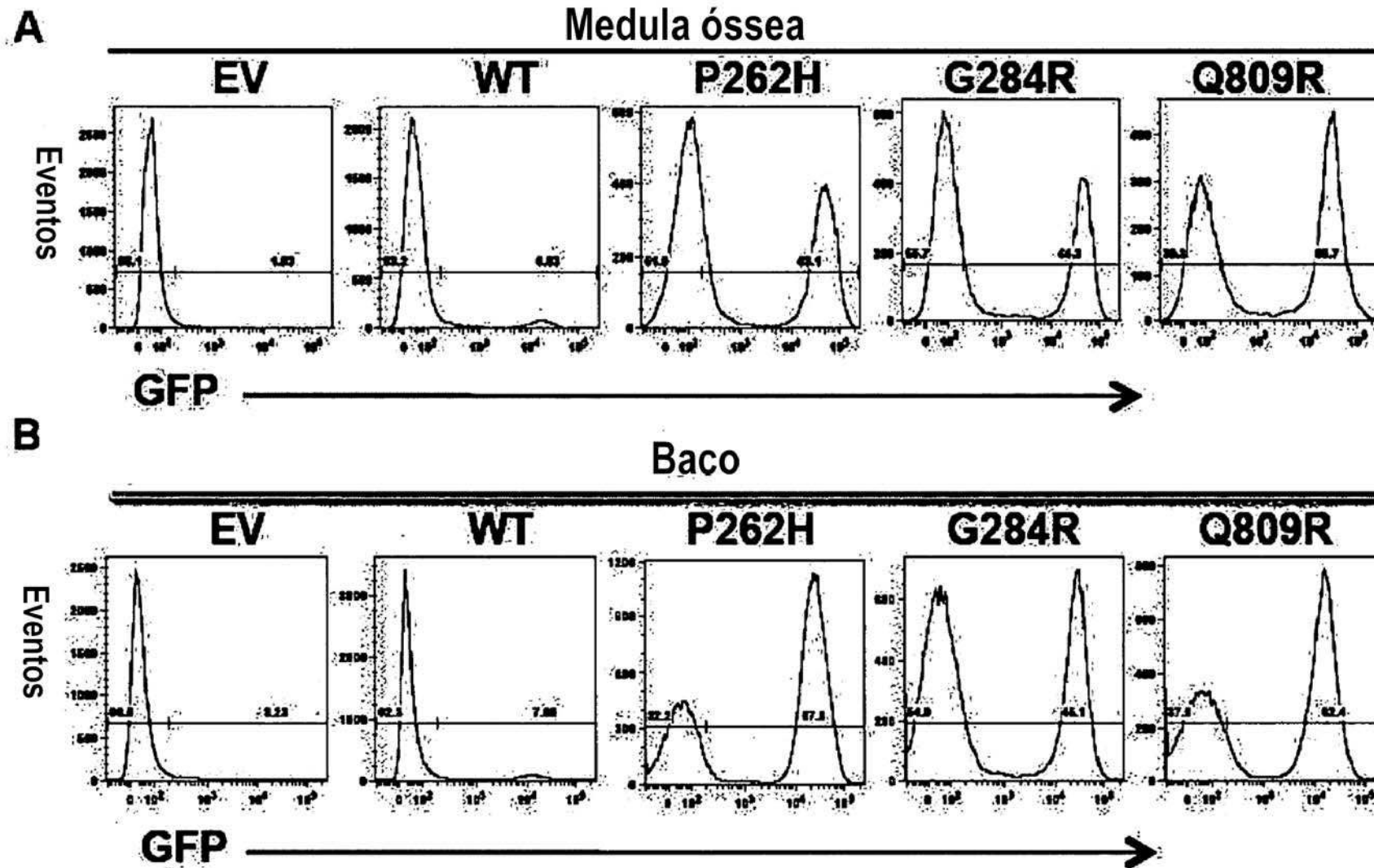


Fig. 24

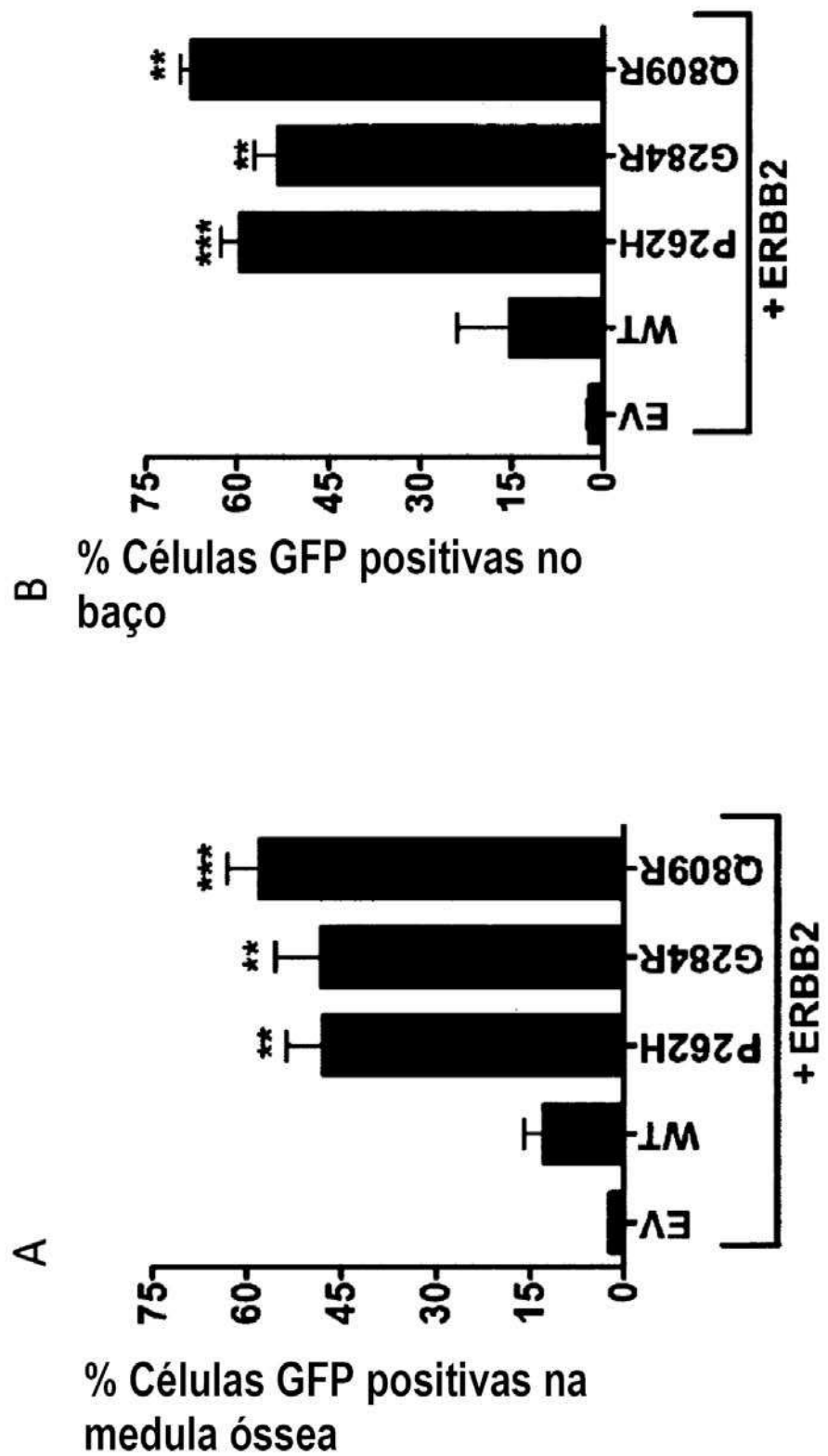


Fig. 25

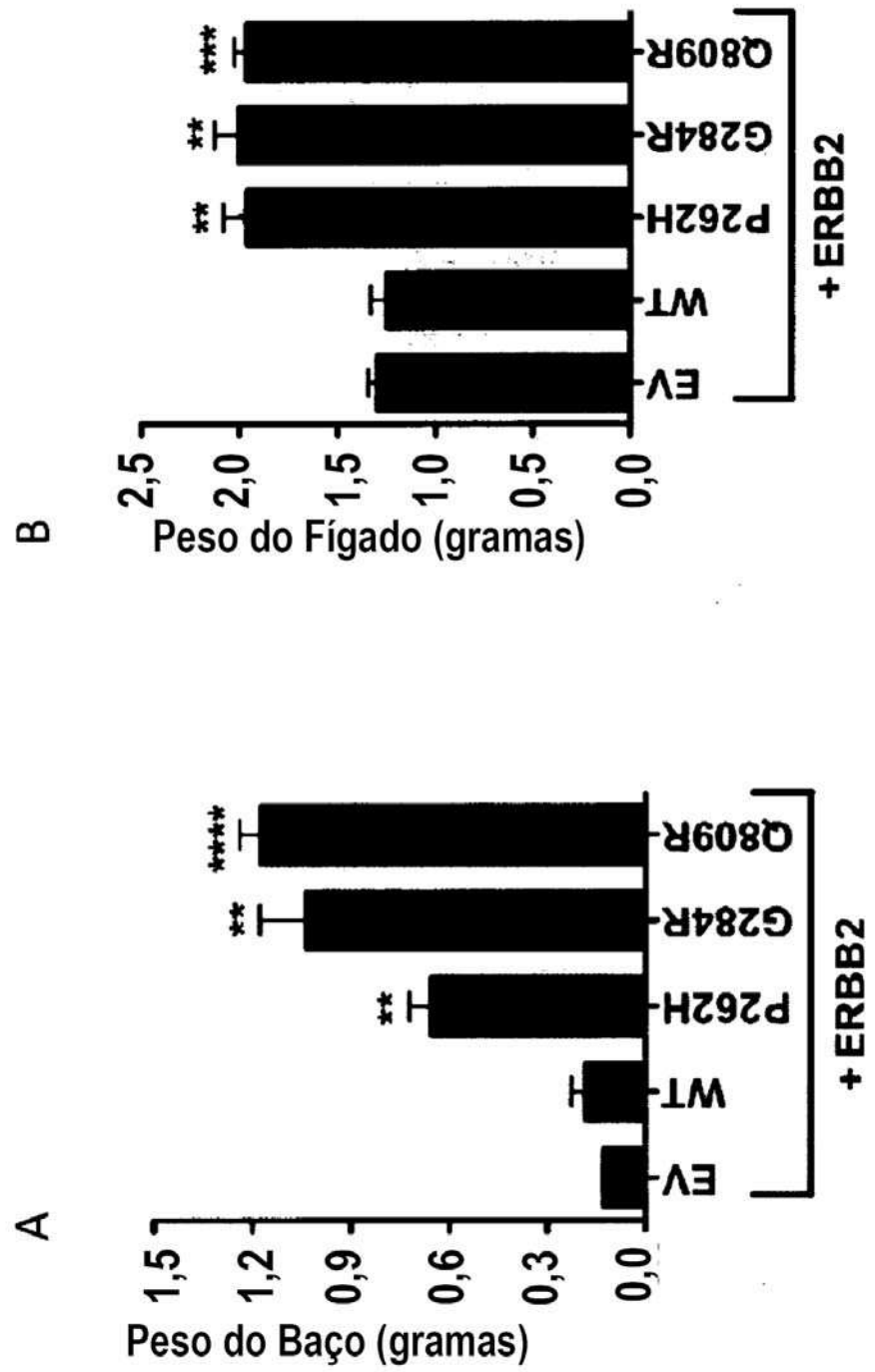


Fig. 26

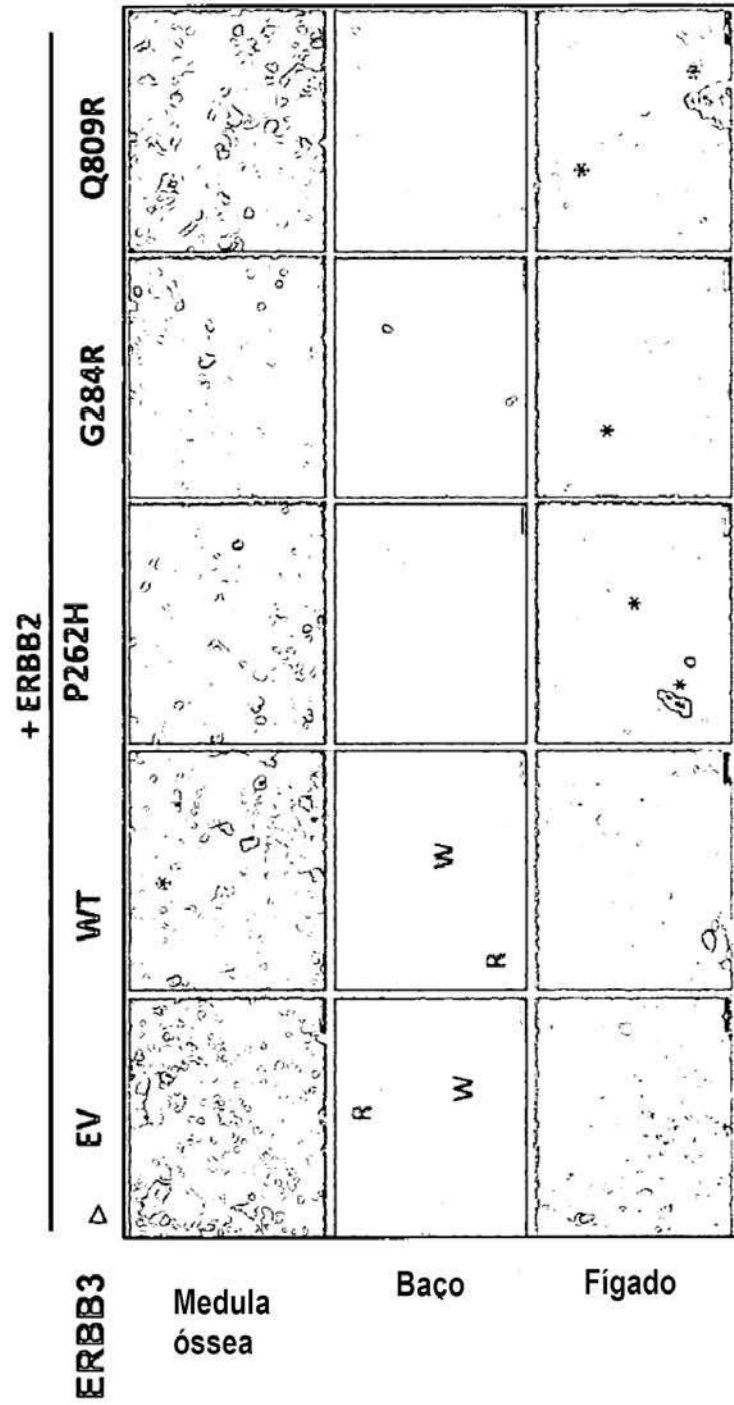


Fig. 27

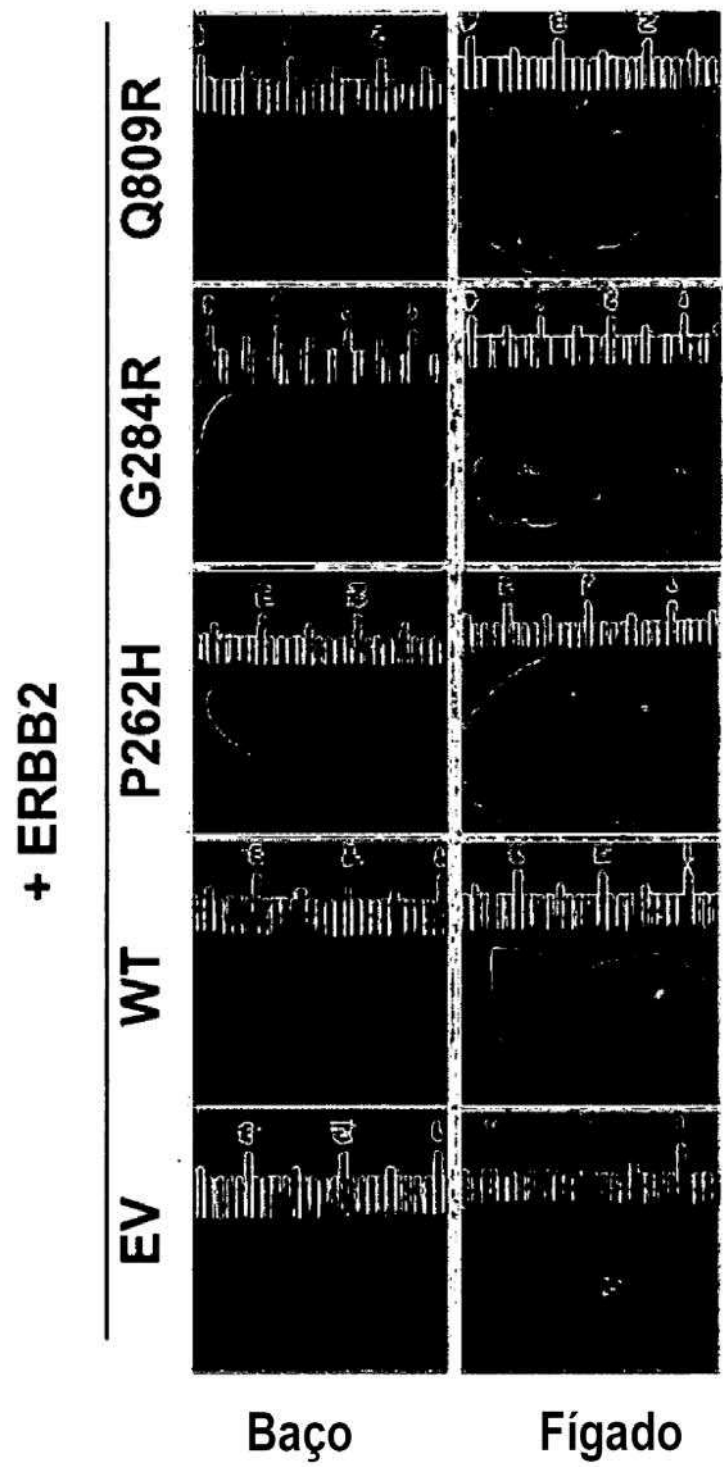


Fig. 28

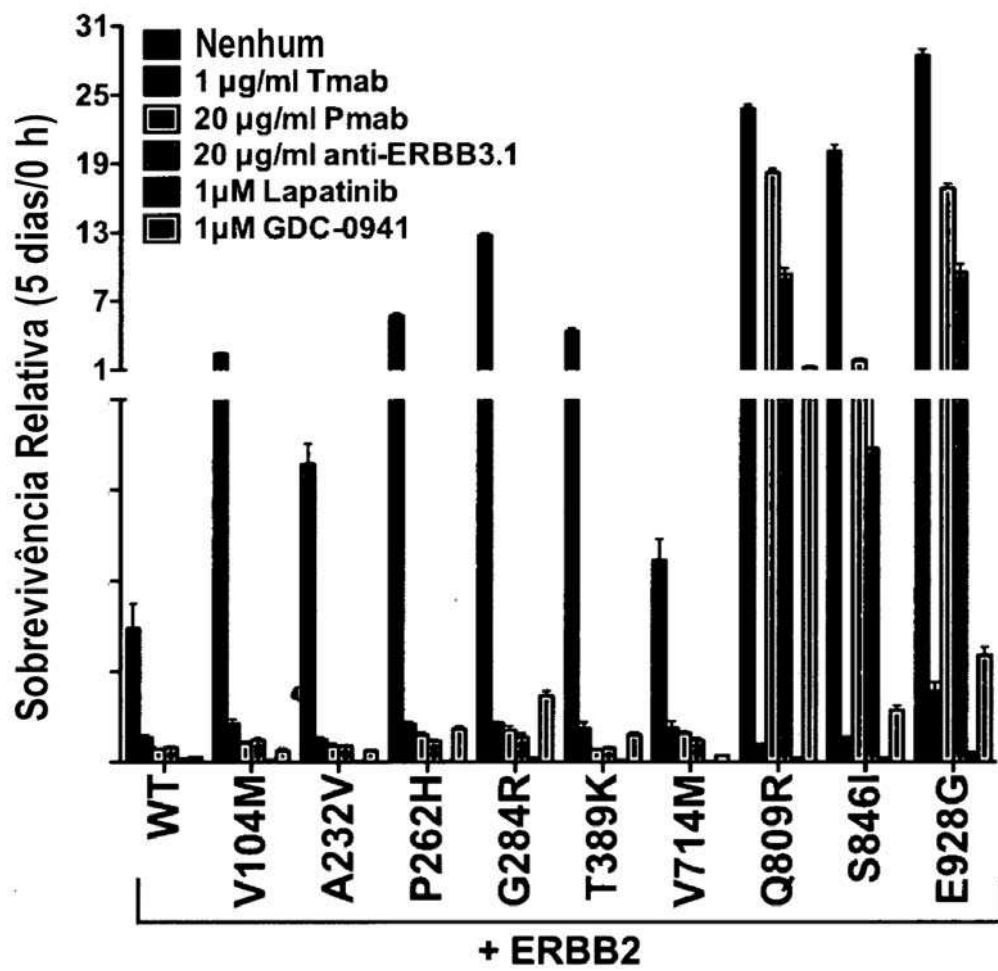


Fig. 29

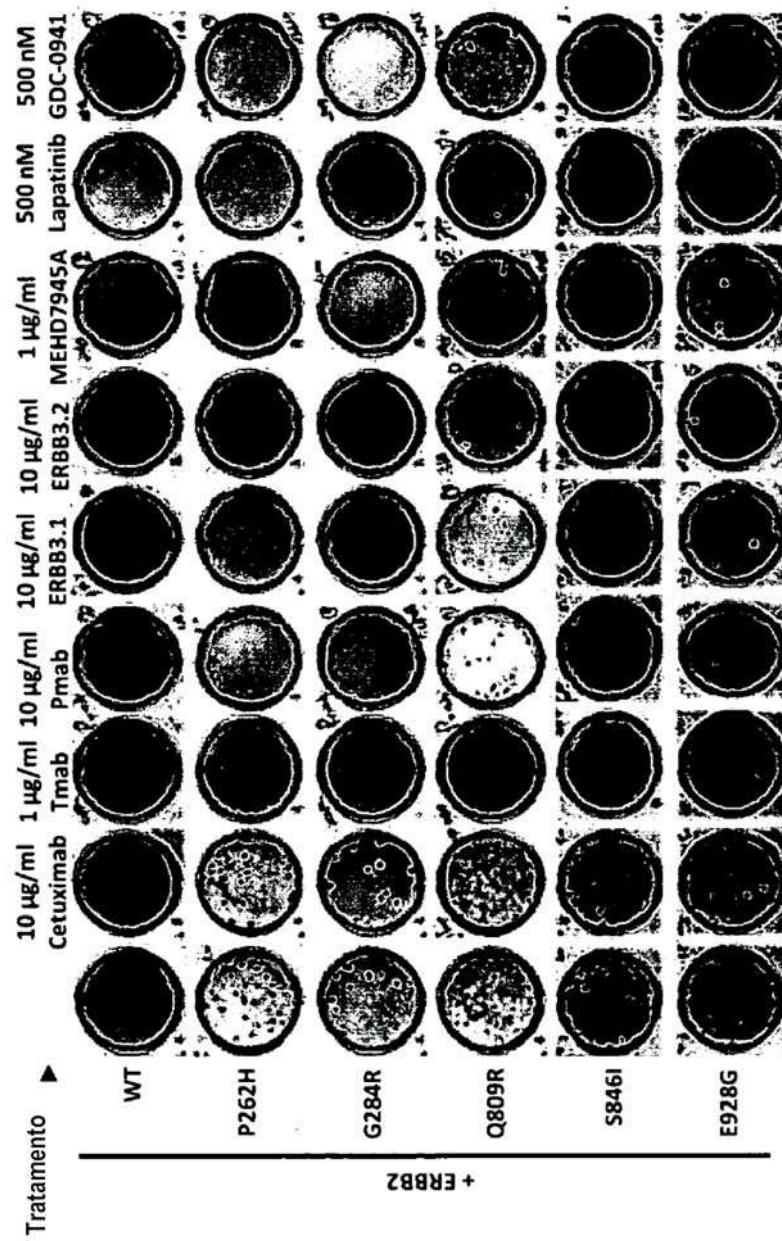


Fig. 30

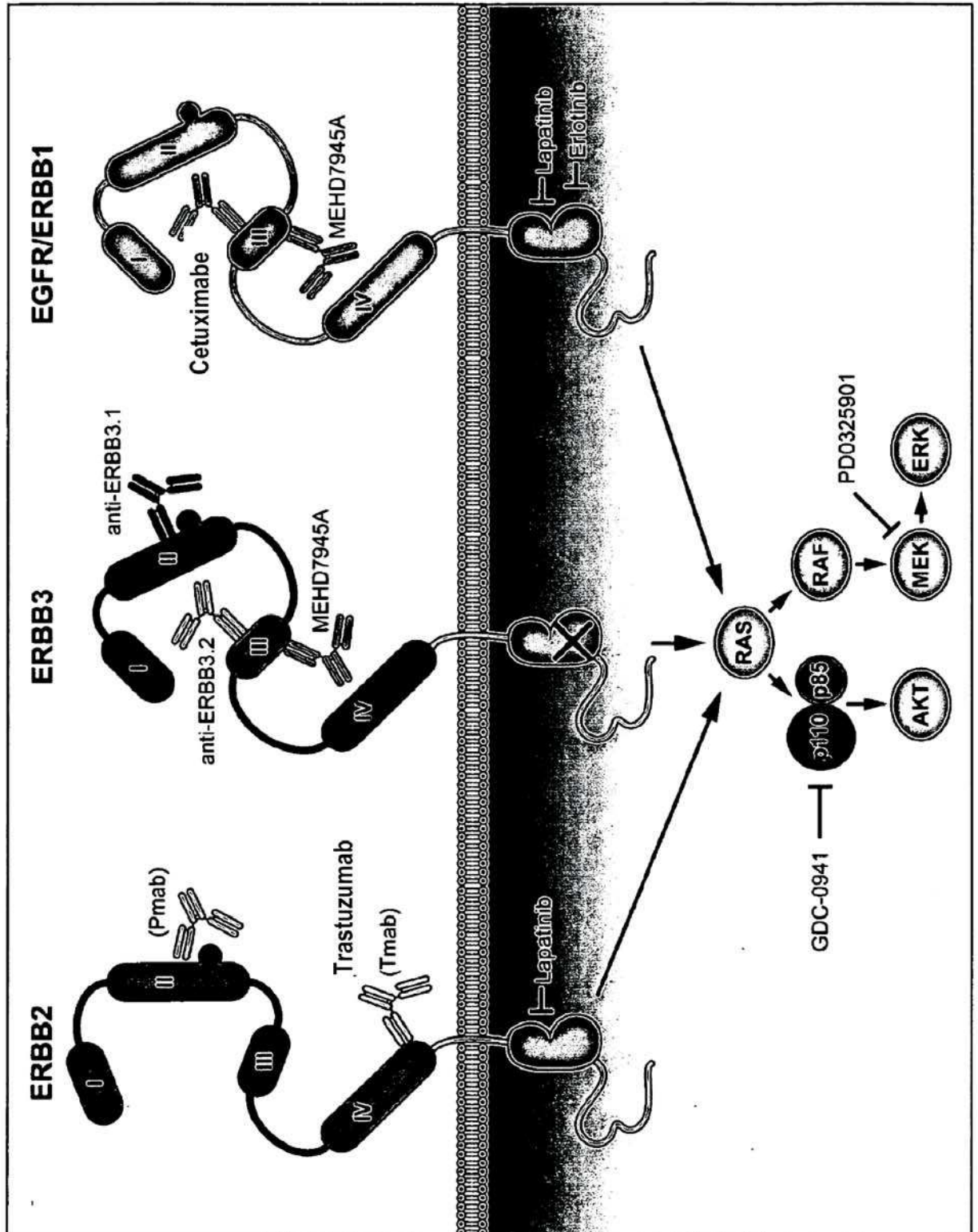
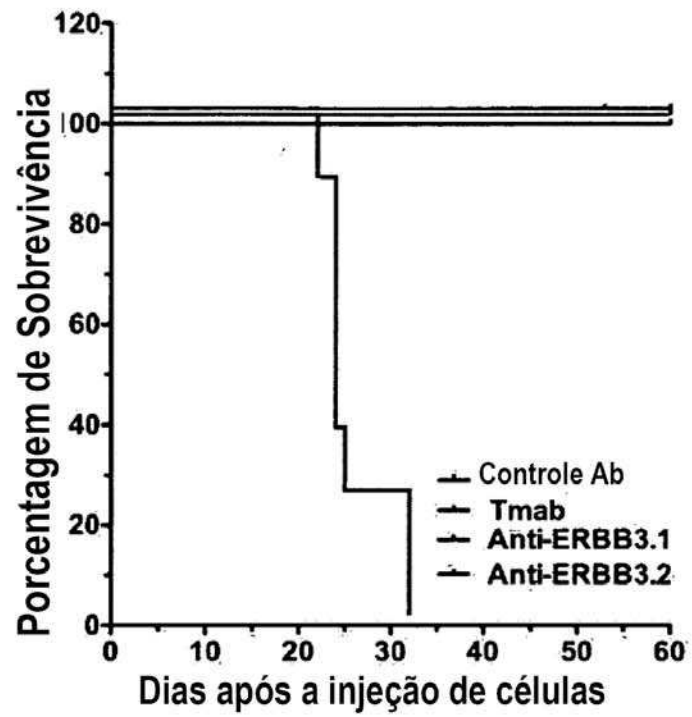


Fig. 31

A



B

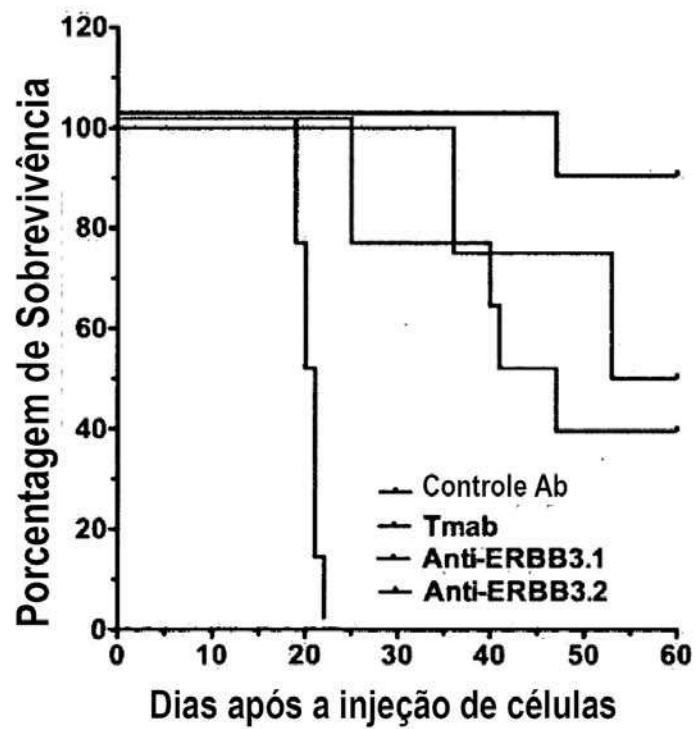


Fig. 32

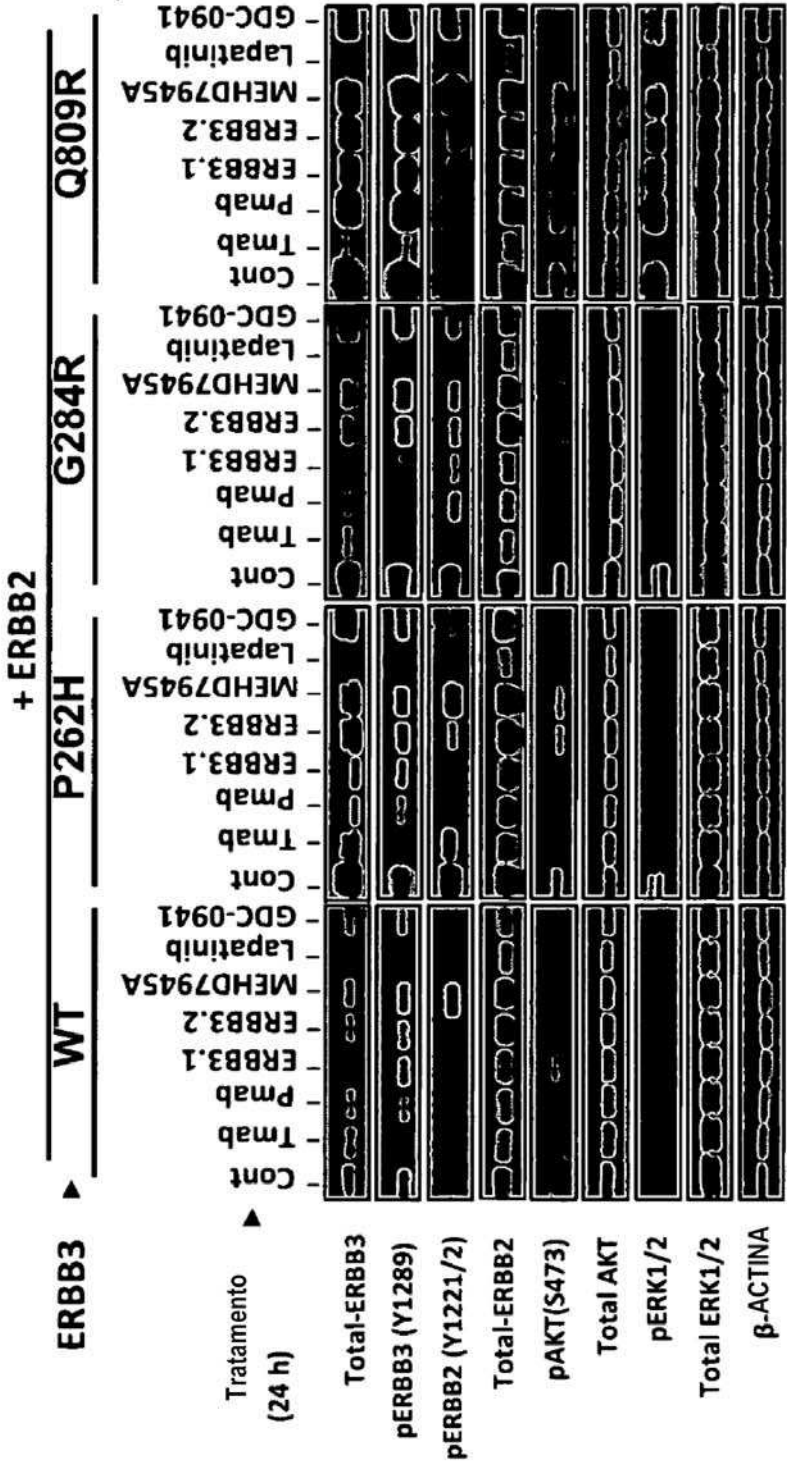


Fig. 33

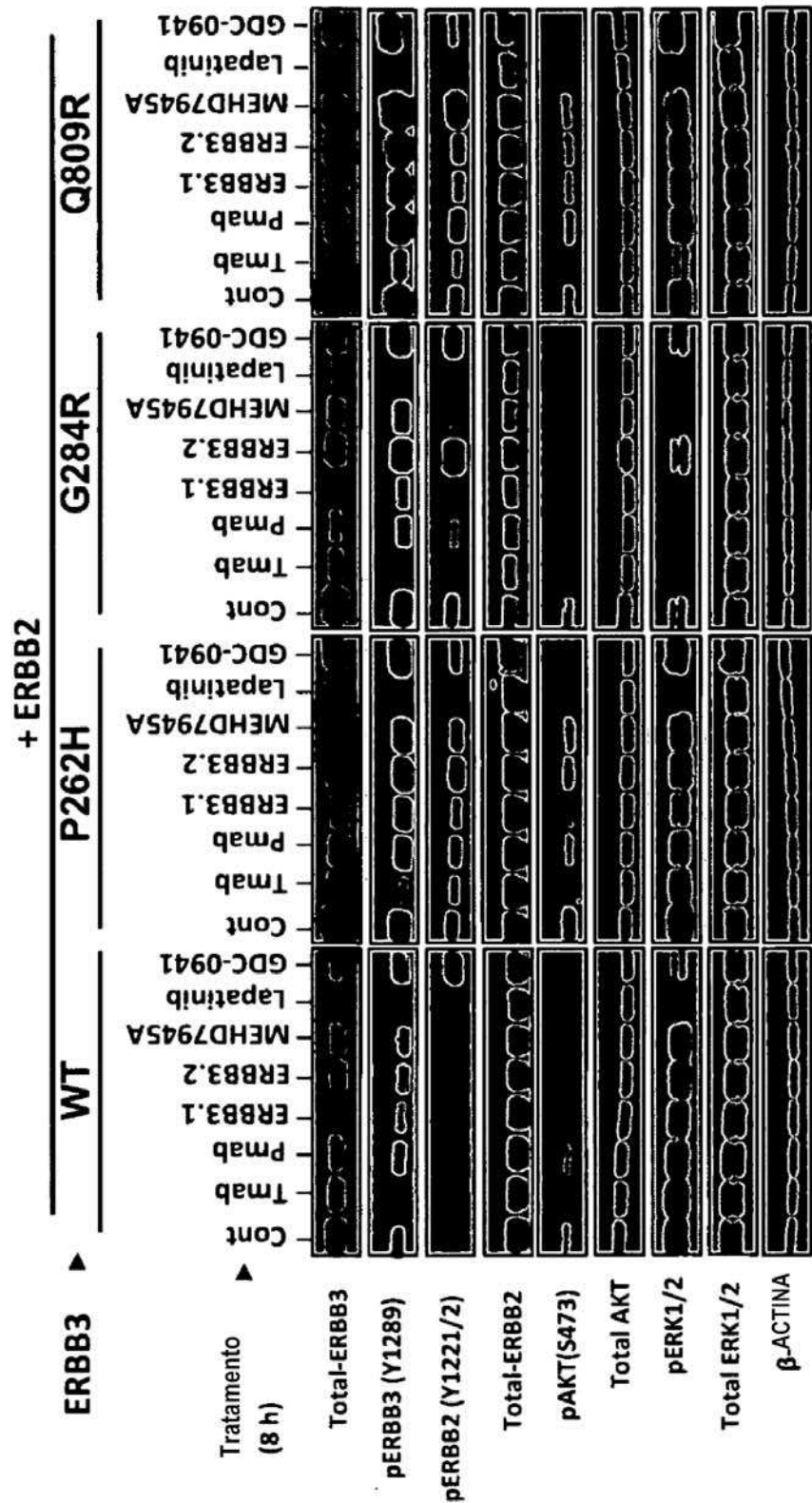
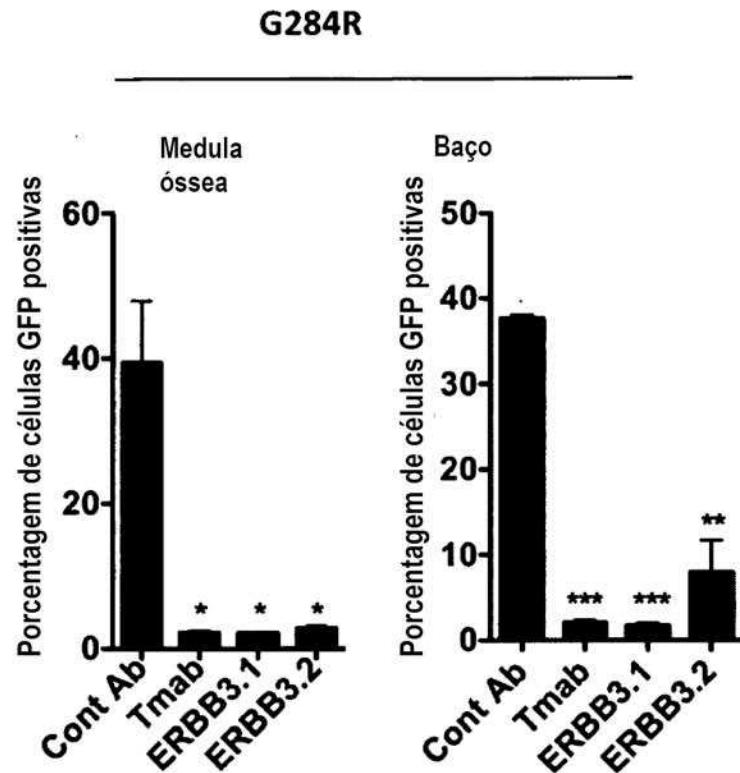


Fig. 34

A



B

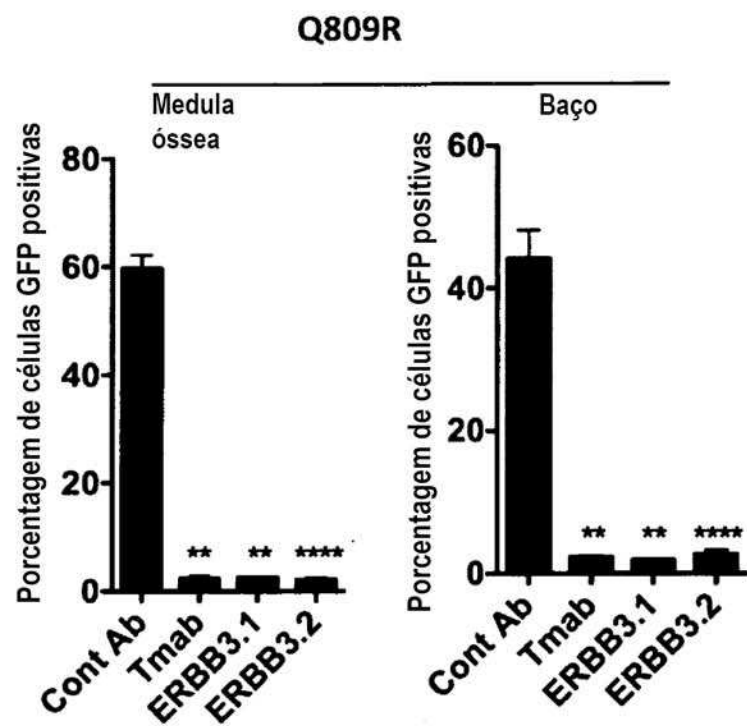


Fig. 35

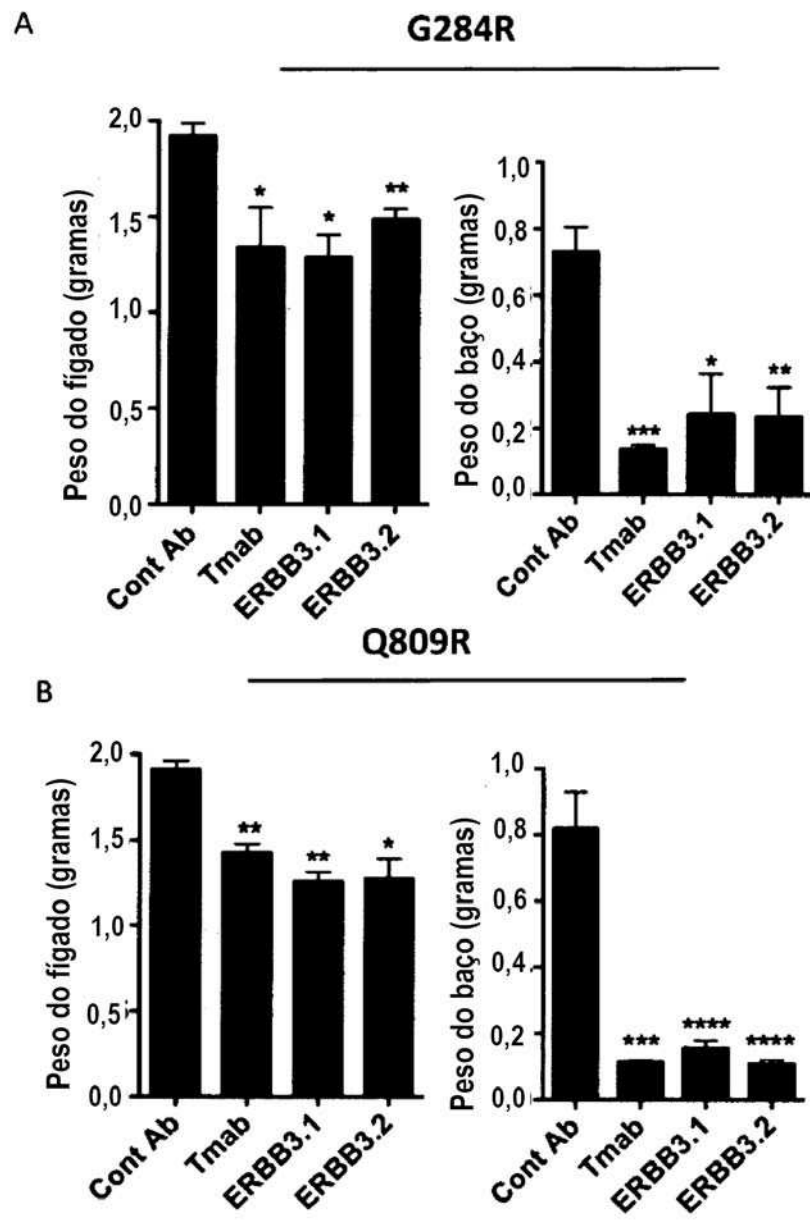


Fig. 36

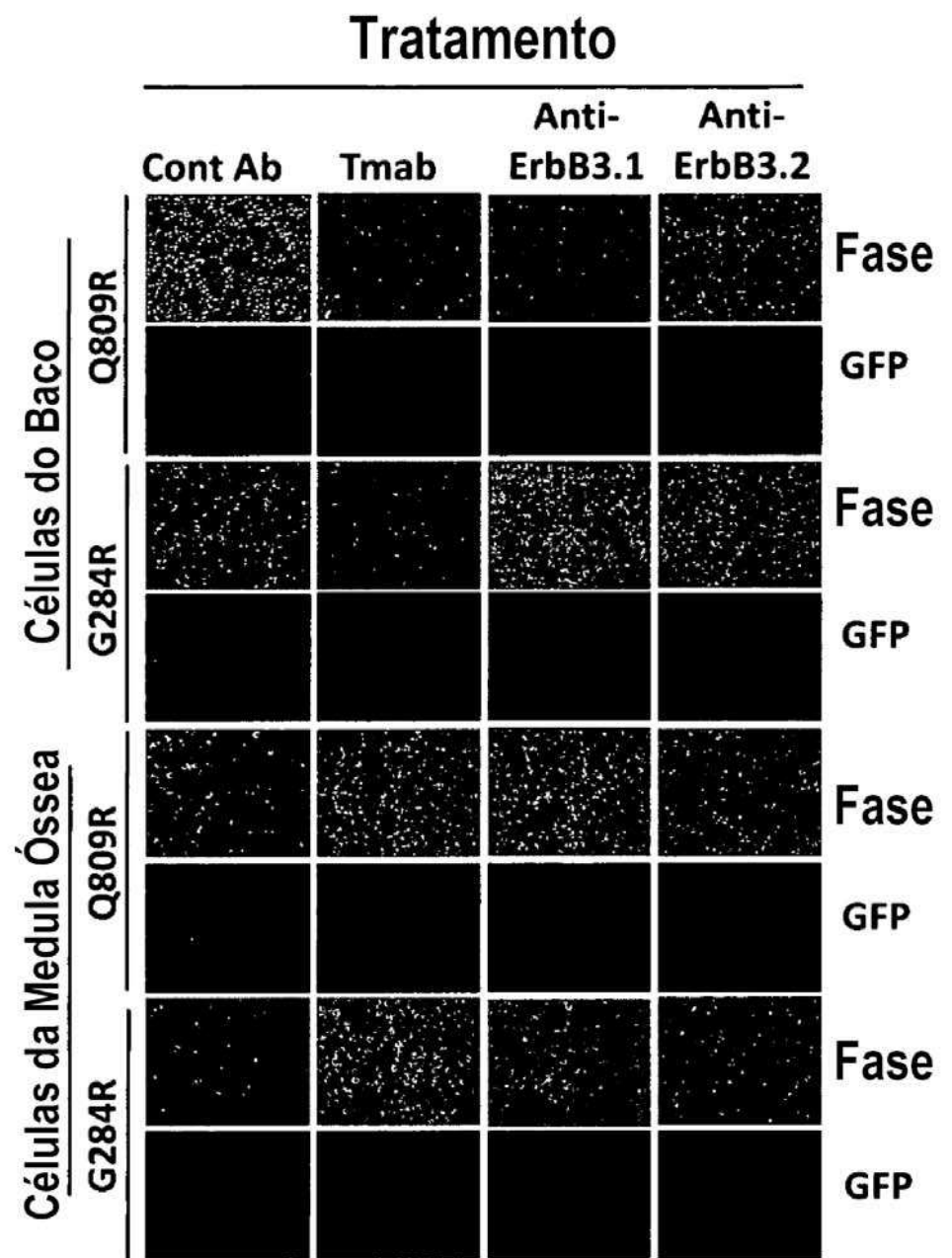
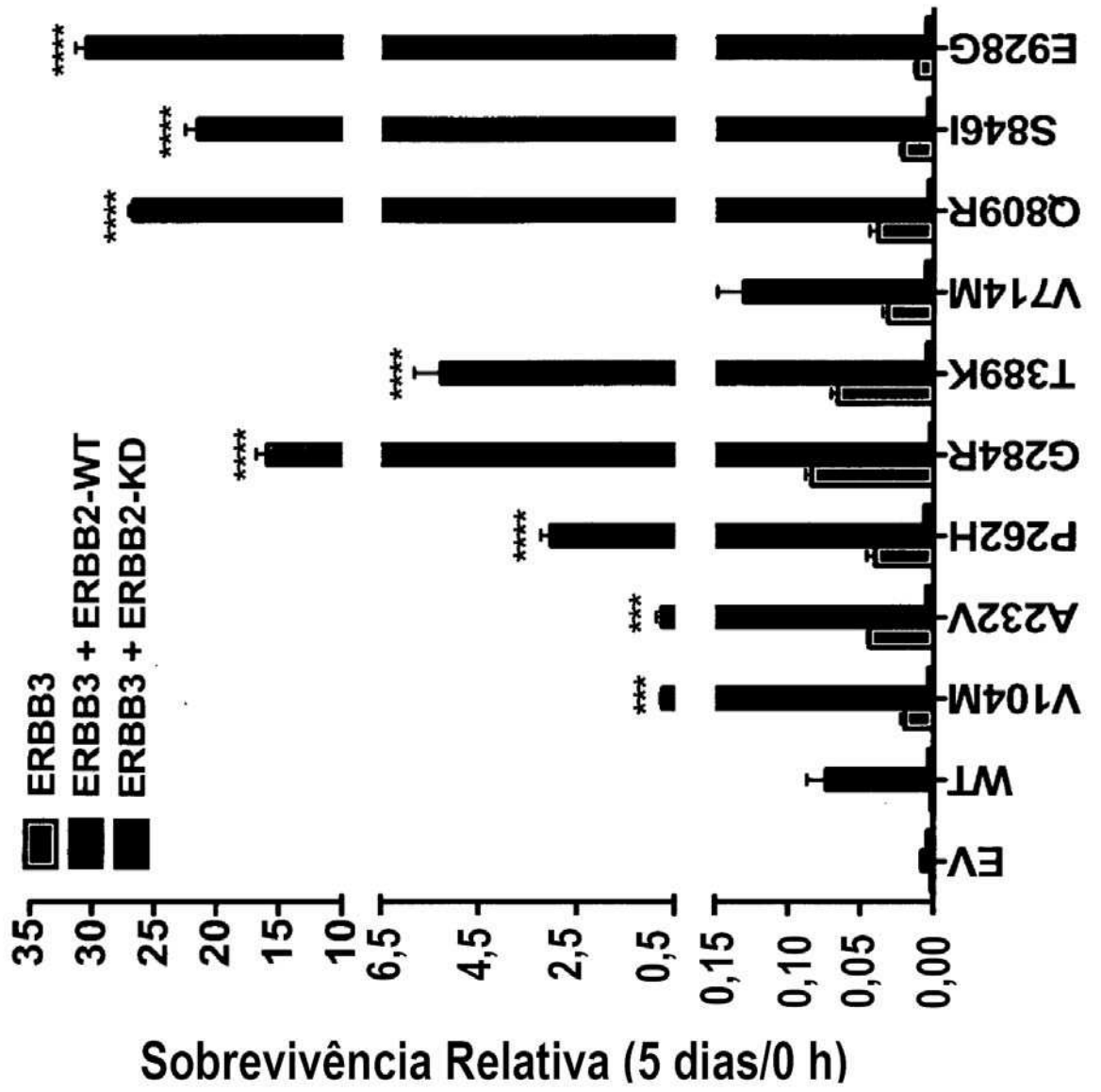


Fig. 37



A

Fig. 37

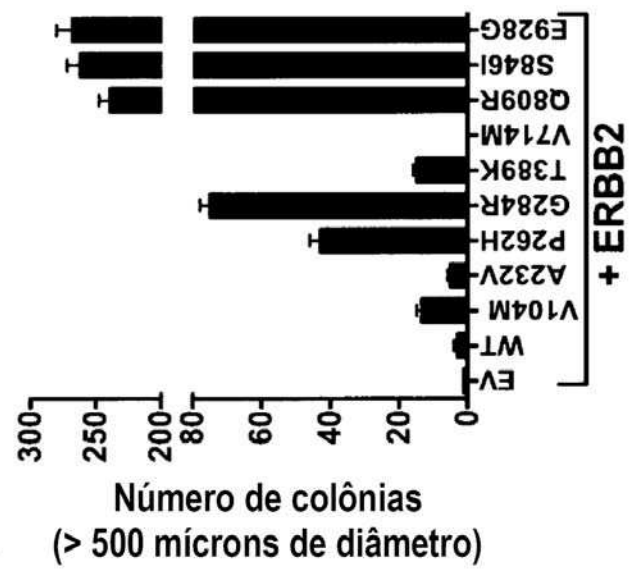
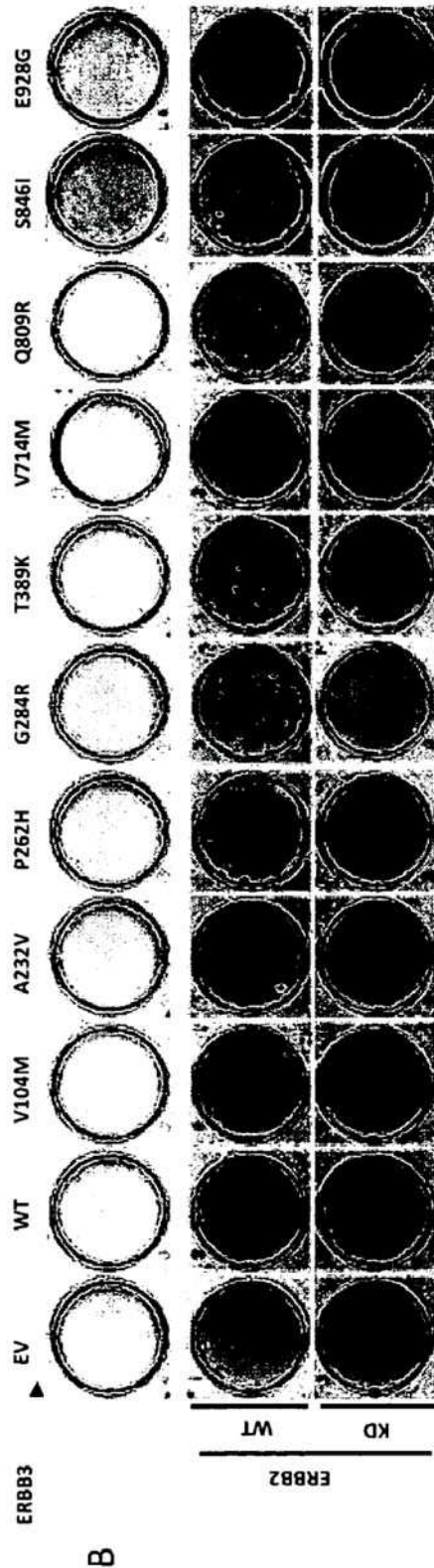


Fig. 37

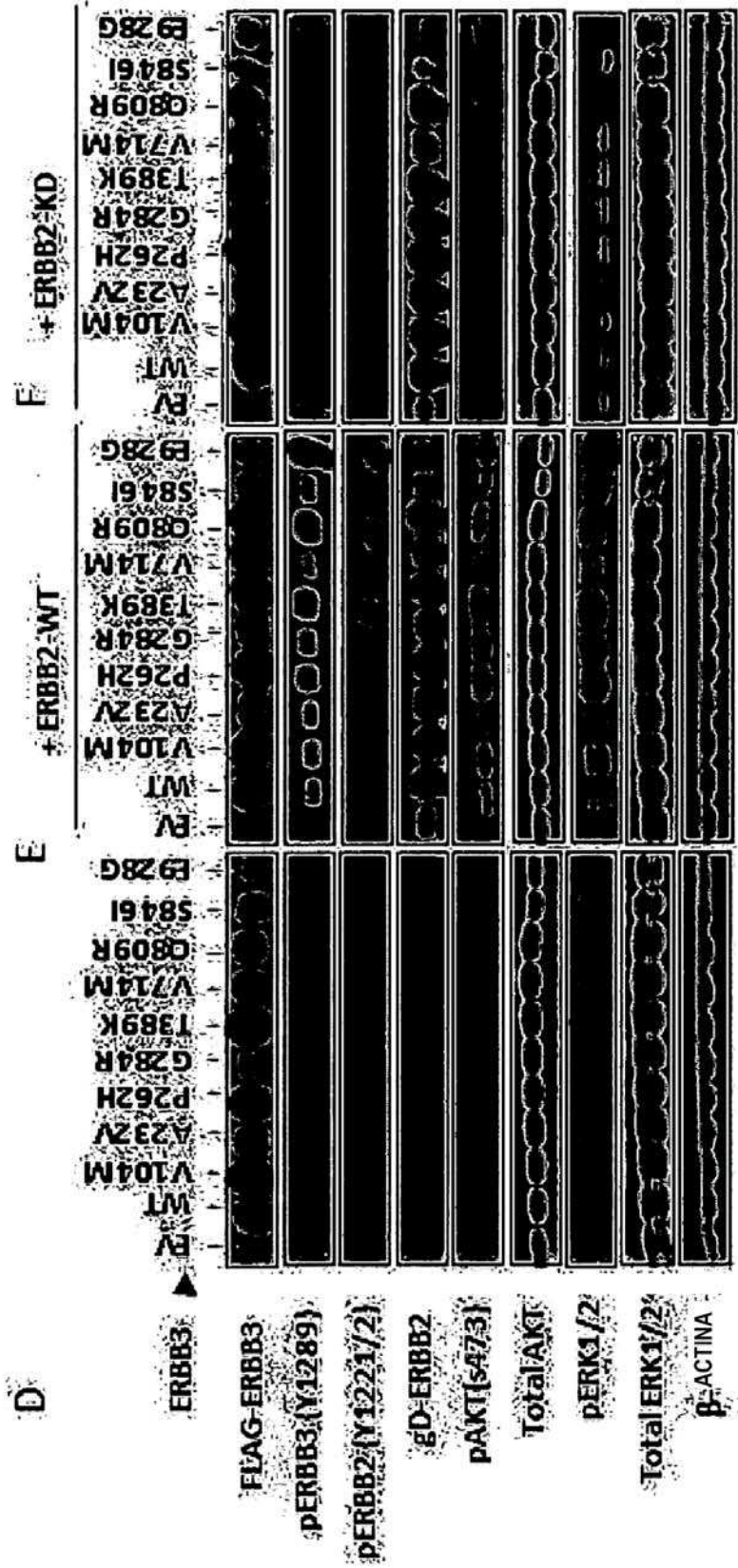


Fig. 37

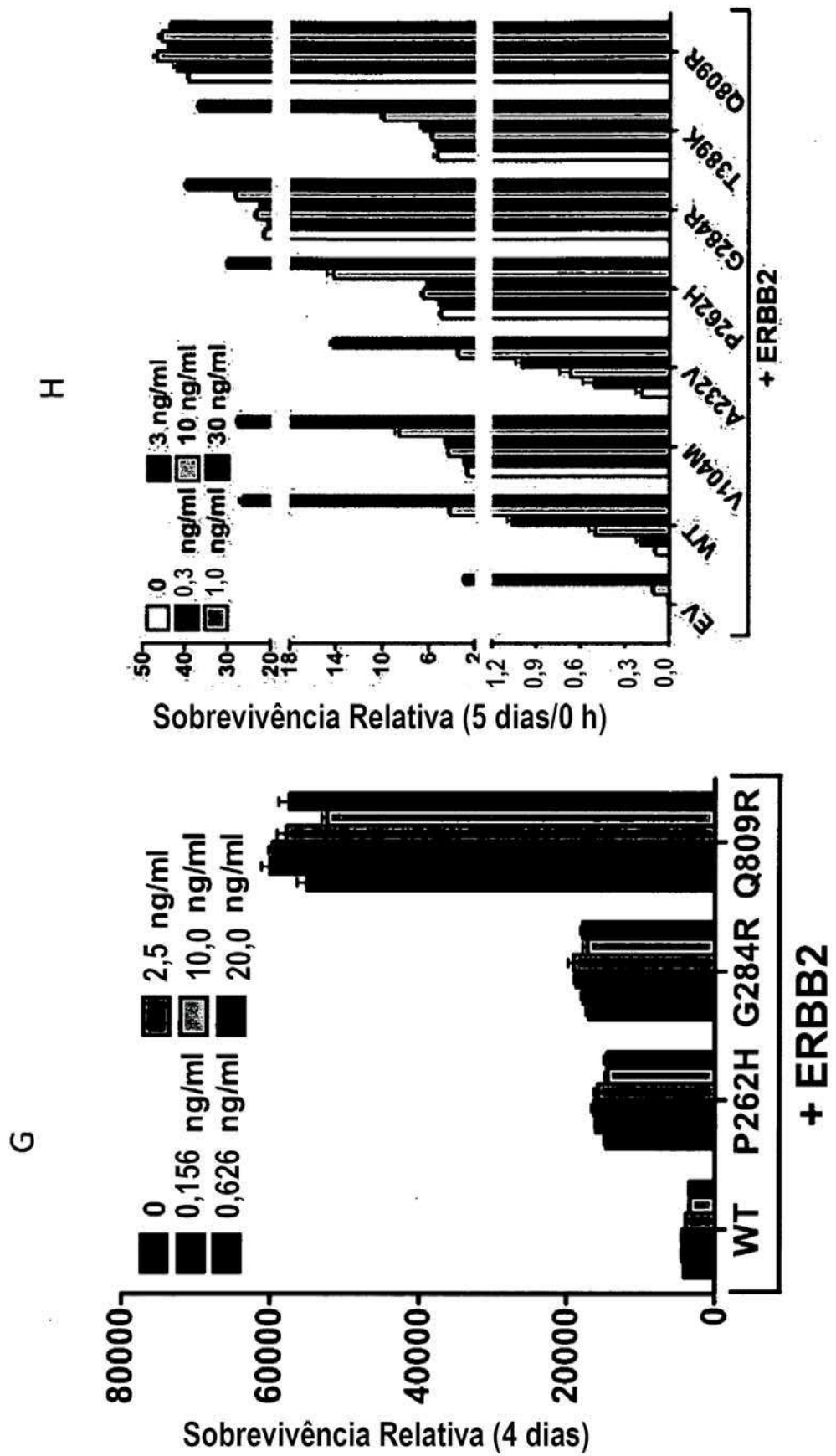


Fig. 38

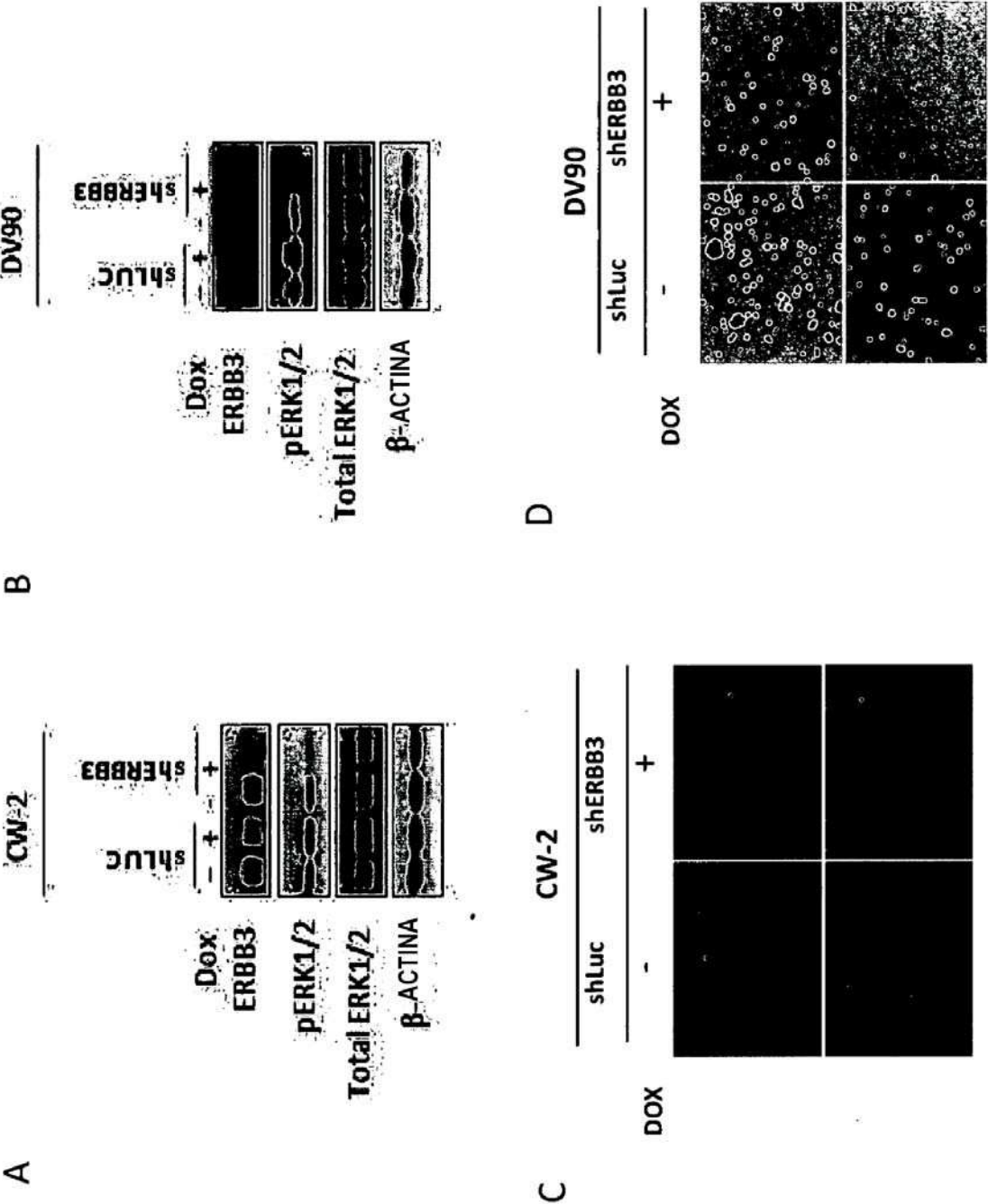


Fig. 38

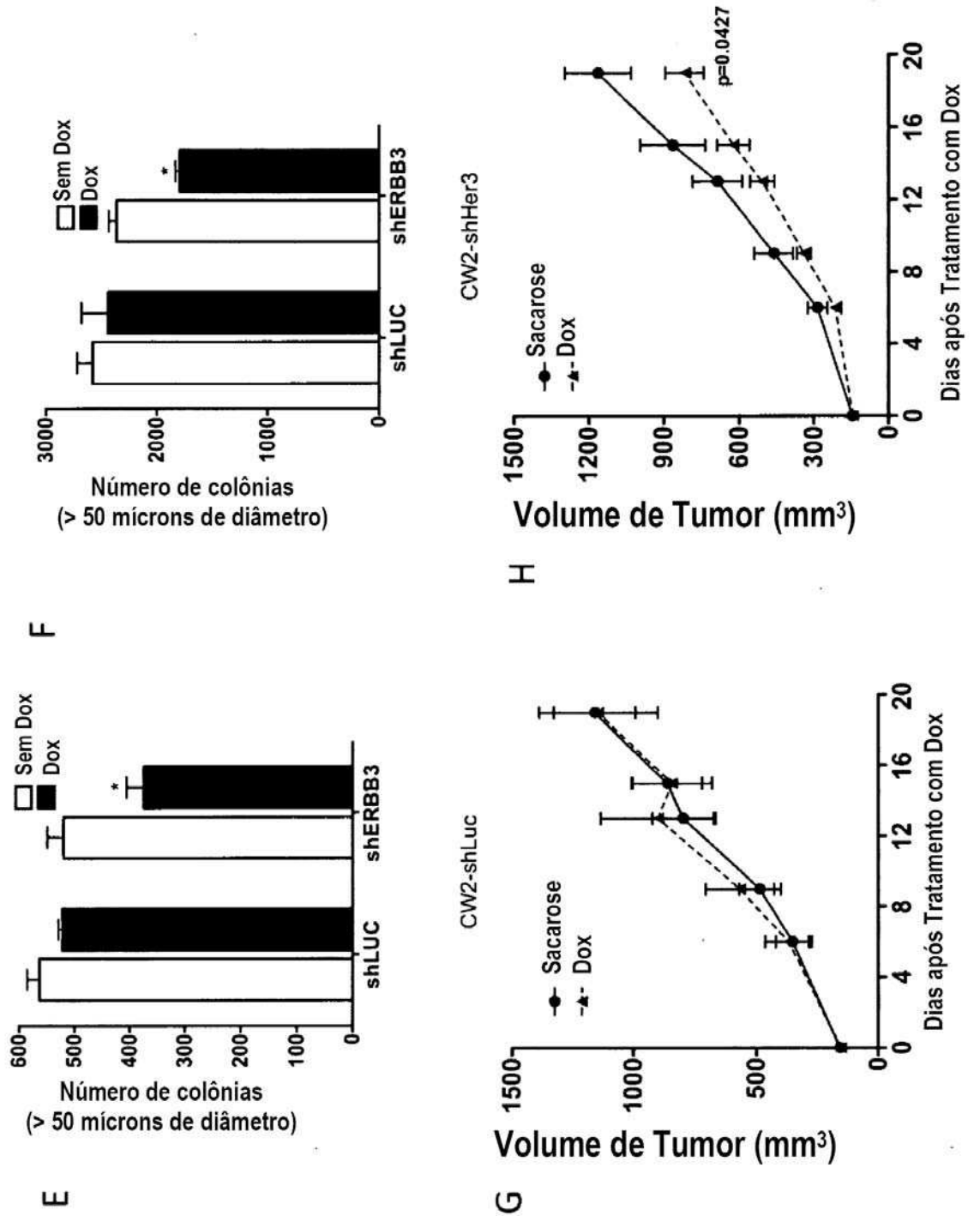


Fig. 38

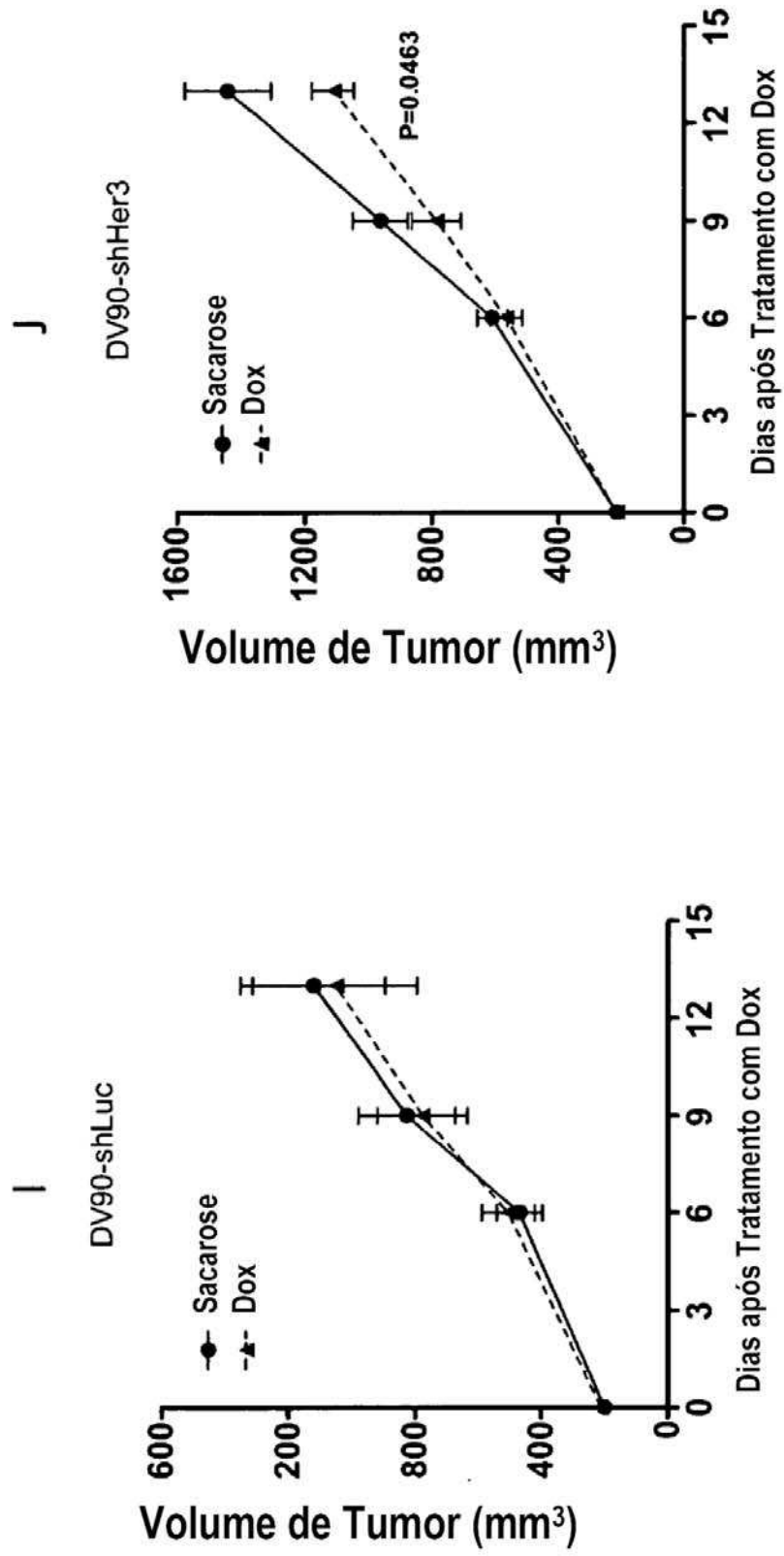


Fig. 39

Atgagggcgaacgacgctctgcaggtgctgggcttgcttttcagcctggcccggggctcc
 M R A N D A L Q V L G L L F S L A R G S 20
 gaggtgggcaactctcaggcagtggtcctgggactctgaatggcctgagtgtagccggc
 E V G N S Q A V C P G T L N G L S V T G 40
 gatgctgagaaccaataccagacactgtacaagctctacgagaggtgtgaggtggtg^{atg}
 D A E N Q Y Q T L Y K L Y E R C E V V ^M 60
 gggaaccttgagattgtgctcacg^{gga}cacaatgccgacctctccttctcctgcagtggatt
 G N L E I V L T ^G H N A D L S F L Q W I 80
 cgagaagtgcacaggctatgtcctcgtggc^{atg}aatgaattctctactctaccattgccc
 R E V T G Y V L V A ^M N E F S T L P L P 100
 aacctccg^{gtg}gtg^{gtg}cgagggaccaggtctacgatgggaagtttgccatcttcgctcatg
 N L R ^V V R G T Q V ^Y D G K F A I F V M 120
 ttgaactataacaccaactccagccacgctctgcgccagctc^{cgct}tgactcagctcacc
 L N Y N T N S S H A L R Q L ^R L T Q L T 140
 gagattctgtcagggggtgtttatattgagaagaacgataagctttgtcacatggacaca
 E I L S G G V Y I E K N D K L C H M D T 160
 attgactggaggacatcgtgagggaccgagatgctgagatagtggtgaaggacaatggc
 I D W R D I V R D R D A E I V V K D N G 180
 agaagctgtccccctgtcatgaggtttgcaagggg^{cga}tgctggggctcctggatcagaa
 R S C P P C H E V C K G ^R C W G P G S E 200
 gactgccagacattgaccaagaccatctgtgctcctcagtgtaatggcactgctttggg
 D C Q T L T K T I C A P Q C N G H C F G 220
 cccaaccccaaccagtgtgcatgatgagtg^{gcc}gggggtgctcaggccctcaggac
 P N P N Q C C H D E C ^A G G C S G P Q D 240
 acagactgctttgcctgccggcacttcaatgacagtgaggcctgtgtacctcgctgtcca
 T D C F A C R H F N D S G A C V P R C P 260
 cag^{cct}ctgtctacaacaagctaactttc^{cag}ctggaacccaatccccacaccaagtat
 Q ^P L V Y N K L T F ^Q L E P N P H T K Y 280
 cagtatggaggagtttgtgtagccagctgtccccataacttt^{gtg}gtg^{gatcaaa}acatcc
 Q Y G G V C V A S C P H N F ^V V ^D ^Q T S 300
 tgtgtcagggcctgtcctcctgacaagatggaagtagataaaaatgggctcaagatgtgt
 C V R A C P P D K M E V D K N G L K M C 320
 gagccttgtggg^{gga}ctatgtcccaaagcctgtgaggggaacaggctctgggagccgcttc
 E P C G ^G L C P K A C E G T G S G S R F 340
 cagactgtggactcgagcaacattgatggatttgtgaactgc^{acca}agatcctgggcaac
 Q T V D S S N I D G F V N C ^T K I L G N 360
 ctggactttctgatcaccggcctcaatggagaccctggcacaagatccctgccctggac
 L D F L I T G L N G D P W H K I P A L D 380
 ccagagaagctcaatgtcttccg^{aca}gtacgggagatcacaggttacctgaacatccag
 P E K L N V F R ^T V R E I T G Y L N I Q 400
 tcctggccgccccac^{atg}cacaacttcagtgtttttccaatttgacaaccattggaggc
 S W P P H ^M H N F S V F S N L T T I G G 420
 agaagcctctacaaccggggttctcattgttgatcatgaagaacttgaat^{gtc}acatct
 R S L Y N R G F S L L I M K N L N ^V T S 440
 ctgggcttccgatccctgaaggaaattagtgtgg^{cgt}atctatataagtgccaatagg
 L G F R S L K E I S A G ^R I Y I S A N R 460
 cagctctg^{tac}caccactctttgaactggaccaaggtgcttcgggggcctacggaagag
 Q L C ^Y H H S L N W T K V L R G P T E E 480
 cgactagacatcaagcataatcgccgcgcagag^{gac}tgctggcagagggc^{aaag}tggtgt
 R L D I K H N R P R R ^D C V A E G ^K V C 500
 gacccactgtgctcctctgggggatgctggggccaggccctggtcagtgttctgt
 D P L C S S G G C W G P G P G Q C L S C 520

Fig. 39 (continuação)

cgaaattatagccgaggaggtgtctgtgtgacccactgcaactttctgaatggggagcct	540
R N Y S R G G V C V T H C N F L N G E P	
cgagaatttgcccatgaggccgaatgcttctcctgccacccggaatgccaacccatggag	560
R E F A H E A E C F S C H P E C Q P M E	
ggcactgccacatgcaatggctcgggctctgatacttgtgtcgaatgtgccattttcga	580
G T A T C N G S G S D T C A Q C A H F R	
gatgggccccactgtgtgagcagctgcccccatggagtcctaggtgccaagggcccaatc	600
D G P H C V S S C P H G V L G A K G P I	
tacaagtaccagatgttcagaatgaatgtcggccctgccatgagaactgcacccagggg	620
Y K Y P D V Q N E C R P C H E N C T Q G	
tgtaaaggaccagagcttcaagactgttttaggacaaacactgggtgctgatcggcaaaacc	640
C K G P E L Q D C L G Q T L V L I G K T	
catctgacaatggctttgacagtgatagcaggattggtagtgattttcatgatgctgggc	660
H L T M A L T V I A G L V V I F M M L G	
ggcacttttctctactggcgtgggcgcggattcagaataaaaagggtatgaggcgatac	680
G T F L Y W R G R R I Q N K R A M R R Y	
ttggaacggggtgagagcatagagcctctggacccagtgagaaggctaacaaagtcttg	700
L E R G E S I E P L D P S E K A N K V L	
gccagaatcttcaaagagacagagctaaggaagcttaaaagtgtgctcgggtgtcttt	720
A R I F K E T E L R K L K V L G S G V F	
ggaactgtgcacaaaggagtgtggatccctgaggggtgaatcaatcaagattccagctctgc	740
G T V H K G V W I P E G E S I K I P V C	
attaaagtcattgaggacaagagtggacggcagagttttcaagctgtgacagatcatatg	760
I K V I E D K S G R Q S F Q A V T D H M	
ctggccatttggcagcctggaccatgccacattgtaaggctgctgggactatgccaggg	780
L A I G S L D H A H I V R L L G L C P G	
tcatctctgcagcttgtcactcaatatttgcctctgggttctctgctggatcatgtgaga	800
S S L Q L V T Q Y L P L G S L L D H V R	
caacaccggggggcactggggccaagctgtgctcaactggggagtacaaattgccaaag	820
Q H R G A L G P Q L L L N W G V Q I A K	
ggaatgtactaccttgaggaacatggatggtgcatagaaacctggctgccgaaacgtg	840
G M Y Y L E E H G M V H R N L A A R N V	
ctactcaagtcacccagtcaggttcaggtggcagattttgggtgtggctgacctgctgcct	860
L L K S P S Q V Q V A D F G V A D L L P	
cctgatgataagcagctgctatacagtgaggccaagactccaattaagtggatggccctt	880
P D D K Q L L Y S E A K T P I K W M A L	
gagagtatccactttgggaaatacacacaccagagtgtatgtctggagctatggtgtgaca	900
E S I H F G K Y T H Q S D V W S Y G V T	
gtttgggagttgatgaccttcggggcagagccctatgcagggttacgattggctgaagta	920
V W E L M T F G A E P Y A G L R L A E V	
ccagacctgctagagaagggggagcgggtggcacagccccagatctgcacaattgatgtc	940
P D L L E K G E R L A Q P Q I C T I D V	
tacatggtgatggtcaagtgttgatgattgatgagaacattcgcccaacctttaagaa	960
Y M V M V K C W M I D E N I R P T F K E	
ctagccaatgagttcaccaggatggcccgagacccaccacggtatctggtcataaagaga	980
L A N E F T R M A R D P P R Y L V I K R	
gagagtgggcctggaatagcccctgggcccagagccccatggctctgacaaacaagaagcta	1000
E S G P G I A P G P E P H G L T N K K L	
gaggaagtagagctggagccagaactagacctagaccttagacttggaagcagaggaggac	1020
E E V E L E P E L D L D L D L E A E E D	
aacctggcaaccaccacactgggctccgcctcagcctaccagtttgaacacttaatcgg	1040
N L A T T T L G S A L S L P V G T L N R	

Fig. 39 (continuação)

```

ccacgtgggagccad[agc]cttttaagtccatcatctggatacatgcccataaccagggt      1060
P R G S Q [S] L L S P S S G Y M P M N Q G
aatcttggggagtccttgccaggagtcctgcagtttctgggagcagtgaaacggtgcccccggt
N L G E S C Q E S A V S G S S E R C P R      1080
ccagtctctctacacccaatgccac[ggg]gatgcctggcatcagagtcacagagggggcat
P V S L H P M P [R] G C L A S E S S E G H      1100
gtaacaggctctgaggctgagctccaggagaaagtgtcaatgtgtaggagccggagcagg
V T G S E A E L Q E K V S M C R S R S R      1120
agccggagcccacggccacgcggagatagcgctaccattcccagcgccacagtcctgctg
S R S P R P R G D S A Y H S Q R H S L L      1140
actcctgttacccccactctccccacccgggttagaggaagaggatgtcaacgggttatgtc
T P V T P L S P P G L E E E D V N G Y V      1160
atgccagat[aca]cacctcaaaggtactccctcctcccggaaggcaccctttcttcagtg
M P D [T] H L K G T P S S R E G T L S S V      1180
ggtctcagttctgtcctgggtactgaagaagaagatgaag[gat]gaggagtatgaatacatg
G L S S V L G T E E E D E [D] E E Y E Y M      1200
aaccggaggagaaggcacagtcacacctcatccccctaggccaagttcccttgag[ga]gctg
N R R R R H S P P H P P R P S S L E [E] L      1220
ggttatgagtacatggatgtgggggtcagacctcagtcctctctgggcagcacacagagt
G Y E Y M D V G S D L S A S L G S T Q S      1240
tgcccactccaccctgtacccatcatgcccactgcaggcacaactccagatgaagactat
C P L H P V P I M P T A G T T P D E D Y      1260
gaatatatgaatcggaacgagatggaggtggtcctgggggtgattatgcagccatgggg
E Y M N R Q R D G G G P G G D Y A A M G      1280
gcctgccagcatctgagcaagggtatgaagagatgagagcttttcagggggcctggacat
A C P A S E Q G Y E E M R A F Q G P G H      1300
caggccccccatgtccattatgcccgcctaaaaactctacgtagcttagaggctacagac
Q A P H V H Y A R L K T L R S L E A T D      1320
tctgcctttgataaccctgattactggcatagcaggcttttccccaaggctaatagccag
S A F D N P D Y W H S R L F P K A N A Q      1340
agaacgtaa (SEQ ID NO: 230)
R T - (SEQ ID NO: 231)

```

RESUMO

Patente de Invenção: "**AGENTE DE DETECÇÃO DE CÂNCER GASTROINTESTINAL ErbB3, SEUS USOS, E MÉTODO PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE CÂNCER**".

A presente invenção refere-se a mutações de ErbB3 somáticas em câncer que inclui métodos para identificar, diagnosticar e prognosticar cânceres de ErbB3, assim como métodos para tratar câncer, que inclui certas subpopulações de pacientes. Agente de detecção de câncer gastrointestinal ErbB3 que compreende um reagente capaz de ligar especificamente a uma mutação ErbB3 em uma sequência de ácido nucleico ErbB3.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



1162BBE528AC8BF5

Campo 2



38937481D0786CE3

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P205986.txt
- Data de Geração do Código: 30-06-2014
- Hora de Geração do Código: 14:05:47
- Código de Controle:
 - Campo 1: 1162BBE528AC8BF5
 - Campo 2: 38937481D0786CE3