



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0606839-1 B1**



**(22) Data do Depósito: 02/02/2006**

**(45) Data de Concessão: 30/11/2021**

---

**(54) Título:** USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO UM INIBIDOR IRREVERSÍVEL DE RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

**(51) Int.Cl.:** A61K 31/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 03/02/2005 US 60/649,483; 15/04/2005 US 60/671,989.

**(73) Titular(es):** WYETH LLC; THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** DANIEL HABER; DAPHNE WINIFRED BELL; JEFFREY E. SETTLEMAN; RAFAELLA SORDELLA; NADIA G. GODIN-HEYMANN; EUNICE L. KWAK; SRIDHAR KRISHNA RABINDRAN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2006003717 de 02/02/2006

**(87) Publicação PCT:** WO 2006/084058 de 10/08/2006

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 03/08/2007

**(57) Resumo:** USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO UM INIBIDOR IRREVERSÍVEL DE RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR). A presente invenção é dirigida a métodos para o tratamento de câncer resistente a gefitinib e/ou erlotinib. Um indivíduo com câncer é monitorado para a progressão do câncer após tratamento com gefitinib e/ou erlotinib. A progressão do câncer é indicativa de que o câncer é resistente a gefitinib e/ou erlotinib. Uma vez que a progressão do câncer é notada, o indivíduo é administrado com uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor irreversível de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR). Em formas de realização preferidas, o inibidor irreversível de EGFR é EKB-569, HKI-272 e HKI-357.

“USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO UM INIBIDOR IRREVERSÍVEL DE RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)”



### ANTECEDENTES

5 Cânceres de células epiteliais, por exemplo, câncer da próstata, câncer da mama, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer pancreático, câncer ovariano, câncer do baço, câncer testicular, câncer do timo, etc., são doenças caracterizadas por crescimento anormal, acelerado, de células epiteliais. Este crescimento acelerado inicialmente causa a formação do

10 tumor. Eventualmente, metástase em diferentes sítios de órgãos também podem ocorrer. Apesar de progressos terem sido obtidos no diagnóstico e tratamento de vários cânceres, estas doenças ainda resultam em significativa mortalidade .

15 Câncer de pulmão permanece a causa líder por morte de câncer em países industrializados. Os cânceres que começam nos pulmões são divididos em dois tipos principais, câncer de pulmão de célula não pequena e câncer de pulmão de célula pequena, dependendo de como as células aparecem no microscópio. Câncer de pulmão de célula não pequena (carcinoma de célula escamosa, adenocarcinoma, e carcinoma de célula

20 grande) geralmente se espalha para outros membros mais lentamente do que o câncer de pulmão de célula pequena. Cerca de 75 por cento de casos de câncer de pulmão são categorizados como câncer de pulmão de célula não pequena (por exemplo, adenocarcinomas), e os outros 25 por cento são câncer de pulmão de célula pequena. Câncer de pulmão de célula não pequena

25 (NSCLC) é a causa líder de mortes por câncer nos Estados Unidos, Japão, e Europa Ocidental. Para pacientes com doença avançada, quimioterapia provê um modesto benefício na sobrevivência, mas ao custo de uma significativa toxicidade, ressaltando a necessidade para agentes terapêuticos que são especificamente marcados para as lesões genéticas que dirigem o crescimento

30 do tumor (Schiller JH et al., N Engl J Med, 346: 92-98, 2002).

Receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é uma

proteína ligada a membrana de 170 kilodaltons (kDa) expressada sobre a superfície de células epiteliais. EGFR é um membro da família de receptor de fator de crescimento de proteína tirosina quinases, uma classe de moléculas reguladoras do ciclo celular. (W. J. Gullick et al., 1986, *Cancer Res.*, 46:285-292). EGFR é ativado quando seu ligando (ou EGF ou TGF- $\alpha$ ) liga ao domínio extracelular, resultando em autofosforilação do domínio de tirosina quinase intracelular do receptor (S. Cohen et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255:4834-4842; A. B. Schreiber et al., 1983, *J. Biol. Chem.*, 258:846-853).

EGFR é o produto de proteína de um oncogene promotor do crescimento, *erbB* ou *ErbB1*, que é apenas um membro de uma família, isto é, a família ERBB de proto-oncogenes, que se acredita desempenha papéis pivotantes no desenvolvimento e progressão de muitos cânceres humanos. Em particular, expressão aumentada de EGFR foi observada em câncer de mama, bexiga, pulmão, cabeça, pescoço e estômago assim como glioblastomas. A família ERBB de oncogenes codifica quatro, receptores de transmembrana estruturalmente aparentados, ou seja, EGFR, HER-2/neu (*erbB2*), HER-3 (*erbB3*) e HER-4 (*erbB4*). Clinicamente, amplificação e/ou sobreexpressão do receptor do oncogene ERBB em tumores foram registrados como correlacionados com recorrência da doença e prognose fraca do paciente, assim como com responsividade em terapia. (L. Harris et al, 1999, *Int. J. Biol. Markers*, 14:8-15; e J. Mendelsohn e J. Baselga, 2000, *Oncogene*, 19:6550-6565).

EGFR é composto de três domínios principais, ou seja, o domínio extracelular (ECD), que é glicosilado e contém a bolsa de ligação a ligando com duas regiões ricas em cisteína; um domínio de transmembrana curto, e um domínio intracelular que tem atividade de tirosina quinase intrínseca. A região de transmembrana une domínio de ligação a ligando ao domínio intracelular. Análise de seqüência de aminoácidos e de DNA, assim como estudos de formas não glicosiladas de EGFR, indicam que a estrutura

dorsal da proteína de EGFR tem uma massa de 132 kDa, com 1186 resíduos de aminoácidos (A. L. Ullrich et al., 1984, *Nature*, 307:418-425; J. Downward et al., 1984, *Nature*, 307:521-527; C. R. Carlin et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.*, 6:257-264; e F. L. V. Mayes e M. D. Waterfield, 1984, *The EMBO J.*, 3:531-537).

A ligação de EGF ou TGF- $\alpha$  a EGFR ativa uma via de transdução de sinal e resulta em proliferação celular. A dimerização, mudanças conformacionais e internalização de moléculas de EGFR funcionam para transmitir sinais intracelulares levando a regulação do crescimento de células (G. Carpenter e S. Cohen, 1979, *Ann. Rev. Biochem.*, 48:193-216). Alterações genéticas que afetam a regulação de função do receptor de fator de crescimento, ou levam a sobreexpressão de receptor e/ou ligando, resultam em proliferação celular. Além disso, EGFR foi determinado como desempenhando um papel em diferenciação de células, melhora da motilidade de células, secreção de proteínas, neovascularização, invasão, metástase e resistência de células de câncer a agentes quimioterapêuticos e radiação. (M.-J. Oh et al., 2000, *Clin. Cancer Res.*, 6:4760- 4763).

Vários inibidores de EGFR foram identificados, incluindo vários já sofrendo experiências clínicas para o tratamento de vários cânceres. Para um recente sumário, ver de Bono, J. S. e Rowinsky, E. K. (2002), "The ErbB Receptor Family: A Therapeutic Target For Cancer", *Trends in Molecular Medicine*, 8, S 19-26.

Um conjunto promissor de marcações para intervenção terapêutica no tratamento de câncer inclui os membros do eixo HER-quinase. Eles são com freqüência regulados de modo positivo em tumores epiteliais sólidos de, a título de exemplo, a próstata, pulmão e mama, e são também regulados de modo positivo em tumores de glioblastoma. Receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um membro do eixo HER-quinase, e foi a marcação de escolha para o desenvolvimento de várias diferentes terapias

para câncer. Os inibidores de EGFR tirosina quinase (EGFR-TKIs) estão dentro destas terapias, devido à fosforilação reversível de resíduos de tirosina é requerida para a ativação da via EGFR. Em outras palavras, EGFR-TKIs bloqueia um receptor de superfície celular responsável por disparar e/ou  
5 manter a via de sinalização celular que induz o crescimento e divisão de células de tumor. Especificamente, acredita-se que estes inibidores interferem com o domínio de EGFR quinase, referido como HER-I . Dentre os mais promissores EGFR-TKIs, estão três séries de compostos: quinazolininas, piridopirimidinas e pirrolopirimidinas.

10 Dois dos compostos mais avançados em desenvolvimento clínico incluem Gefitinib (composto ZD 1839 desenvolvido por AstraZeneca UK Ltd.; disponível sob o nome comercial IRESSA; abaixo "IRESSA") e Erlotinib (composto OSI-774 desenvolvido por Genentech, Inc. e OSI Pharmaceuticals, Inc.; disponível sob o nome comercial TARCEVA; abaixo  
15 "TARCEVA"); ambos tem gerado resultados clínicos encorajadores. O tratamento de câncer convencional com tanto IRESSA como TARCEVA envolve a administração oral diária de não mais do que 500 mg dos respectivos compostos. Em Maio, 2003, IRESSA se tornou o primeiro destes produtos a alcançar o mercado americano, quando ele foi aprovado para o  
20 tratamento de pacientes com câncer de pulmão de célula não pequena avançado.

IRESSA é uma quinazolina oralmente ativa que funciona ao inibir diretamente a fosforilação de tirosina quinase na molécula de EGFR. Ele compete para o sítio de ligação de adenosina trifosfato (ATP), levando a  
25 supressão do eixo HER-quinase. O exato mecanismo de resposta de IRESSA não é completamente entendido, no entanto, estudos sugerem que a presença de EGFR é um pré-requisito necessário para sua ação.

Uma limitação significativa no uso destes compostos é que seus recipientes podem desenvolver uma resistência a seus efeitos terapêuticos

após terem inicialmente responder à terapia, ou eles podem não responder a EGFR-TKIs em qualquer grau mensurável de todo. A taxa de resposta a EGFR-TKIs varia entre diferentes grupos étnicos. Na extremidade inferior dos respondentes a EGFR-TKI, em algumas populações, somente 10-15 por cento dos pacientes com câncer de pulmão de célula não pequena avançado respondem a inibidores de EGFR quinase. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à sensibilidade a IRESSA e TARCEVA devem se beneficiar extremamente em uma terapia alvo para os indivíduos que irão provavelmente mais se beneficiar desta terapia.

5

● 10

Existe uma necessidade significativa na arte para um tratamento de câncer satisfatório, e especificamente cânceres de células epiteliais como câncer de pulmão, ovariano, mama, cérebro, cólon e da próstata, que incorpore os benefícios da terapia TKI e supere a não responsividade demonstrada pelos pacientes. Este tratamento deve ter um impacto dramático na saúde dos indivíduos, e especialmente indivíduos mais velhos, dentre os quais o câncer é especialmente comum.

15

**SUMÁRIO**

● 20

Os inventores da presente invenção descobriram de modo surpreendente que inibidores de EGFR irreversíveis são efetivos no tratamento de câncer em indivíduos que não estão mais respondendo a terapias com gefitinib e/ou erlotinib. Assim, em uma forma de realização, a presente invenção provê um método para o tratamento de câncer resistente a gefitinib/ erlotinib. Nesta forma de realização, a progressão de câncer em um indivíduo é monitorada em um ponto no tempo após o indivíduo ter iniciado tratamento com gefitinib e/ou erlotinib. Progressão do câncer é indicativa de câncer que é resistente a tratamento com gefitinib e/ou erlotinib e o indivíduo é administrado com uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de receptor de fator de crescimento epidérmico irreversível (EGFR).

25

Em formas de realização preferidas, o inibidor de EGFR

irreversível é EKB-569, HKI-272 ou HKI-357. Alternativamente, o inibidor de EGFR irreversível pode ser qualquer composto que liga a cisteína 797 de EGFR (SEQ ID NO: 1).

5 A progressão de câncer pode ser monitorada por métodos bem conhecidos dos versados. Por exemplo, a progressão pode ser monitorada por meio de inspeção visual do câncer, como, por meio de raio-X, varredura por CT ou MRI. Alternativamente, a progressão pode ser monitorada por meio de detecção de biomarcador de tumor.

10 Em uma forma de realização, o paciente é monitorado em vários pontos no tempo durante todo o tratamento do câncer. Por exemplo, a progressão de um câncer pode ser monitorada por análise a progressão de câncer em um segundo ponto no tempo e comparando esta análise com uma análise em um primeiro ponto no tempo. O primeiro ponto no tempo pode ser antes ou após iniciar o tratamento com gefitinib e/ou erlotinib e o segundo  
15 ponto no tempo é após o primeiro. Um crescimento aumentado do câncer indica progressão do câncer.

Em uma forma de realização, a progressão de câncer é monitorada por análise do tamanho do câncer. Em uma forma de realização, o tamanho do câncer é analisado via inspeção visual do câncer por meio de  
20 raio-X, varredura por CT ou MRI. Em uma forma de realização, o tamanho do câncer é monitorado por meio de detecção de biomarcador de tumor.

Em uma forma de realização, o câncer é câncer de célula epitelial. Em uma forma de realização, o câncer é câncer gastrointestinal, câncer da próstata, câncer ovariano, câncer da mama, câncer de cabeça e  
25 pescoço, câncer do esôfago, câncer de pulmão, câncer de pulmão de célula não pequena, câncer do sistema nervoso, câncer do rim, câncer da retina, câncer da pele, câncer do fígado, câncer pancreático, câncer genito-urinário e câncer da bexiga.

Em uma forma de realização, o tamanho do câncer é

monitorado em pontos no tempo adicionais, e os pontos no tempo adicionais são após o segundo ponto no tempo.

Em uma forma de realização, o último ponto no tempo é pelo menos 2 meses após o ponto no tempo precedente. Em uma forma de realização, o último ponto no tempo é pelo menos 6 meses após ponto no tempo precedente. Em uma forma de realização, o último ponto no tempo é pelo menos 10 meses após os pontos no tempo precedentes. Em uma forma de realização, o último ponto no tempo é pelo menos um ano após ponto no tempo precedente.

10 Em outra forma de realização, a presente invenção provê um método para tratamento câncer, compreendendo administrar a um indivíduo tendo a mutação em EGFR, ou seja, a substituição de uma metionina por uma treonina na posição 790 (T790M) de SEQ ID. No. 1, uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de EGFR irreversível. A mutação de T790M confere resistência a tratamento com gefitinib e/ou erlotinib.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

20 Figuras 1 A-IB mostram análise EGFR de seqüência em lesões metastáticas recorrente de dois pacientes NSCLC com resistência adquirida a gefitinib. Figura IA mostra análise de seqüência para caso 1. A mutação de T790M em EGFR está presente em uma lesão no fígado recorrente após o desenvolvimento de resistência clinica a gefitinib. (Esquerda) A mutação não foi detectada no lesão primária do pulmão no momento da diagnose. (Direita) Tanto a tumor primaria do pulmão e como a lesão recorrente no fígado abrigam a mutação de sensibilização de L858R gefitinib. Deve-se notar, que a mutação L858R está presente na relação esperada para uma mutação heterozigótica em tanto lesões primarias como recorrentes, enquanto T790M é detectável em níveis baixos comparados com o alelo tipo selvagem. Um polimorfismo (G/ A) é mostrado na mesma trilha para demonstrar representação equivalente de dois alelos no produto PCR não clonado. Figura

IB mostra análise de seqüência para caso 2. A mutação T790M está presente de uma minoria pequena de células resistentes a gefitinib. (Esquerda) A mutação T790M não foi detectável nem no tumor primário do pulmão como em oito lesões recorrentes no fígado deste caso por seqüenciamento de produtos PCR não clonados. Heterozigosidade em um polimorfismo adjacente (G/ A) confirma amplificação de ambos alelos EGFR destas amostras. A mutação de sensibilização a gefitinib-, L861Q, foi detectada na relação esperada dentro do tumor primário de pulmão assim como de cada uma das oitos lesões recorrentes do fígado.

10

Figuras 2A-2C mostram resistência adquirida a gefitinib em linhagens de células de câncer broncoalveolar e sensibilidade persistente a inibidores de família ERBB irreversíveis. Figura 2A mostra inibição por inibidores de tirosina quinase de proliferação de linhagens de células de câncer broncoalveolar com EGFR tipo selvagem (NCI-H1 666), a mutação ativante delE746-A750 em EGFR (NCI-H1 650), ou dois subclones representativos resistentes a gefitinib de NCI-H1 650 (G7 e C11). O efeito do inibidor de gefitinib reversível é comparado com que o do inibidor irreversível HKI-357. Comparáveis resultados foram observados com os outros inibidores irreversíveis . Números de células foram medidos por coloração de violeta cristal, após cultura em 5% FCS, com 100 ng/ml EGFR, a 72 h após exposição às indicadas concentrações de fármacos. Cada ponto de dados representa a média de quatro amostras. Figura 2B mostra a estrutura química de gefitinib, um inibidor reversível de EGFR; EKB- 569, um inibidor irreversível de EGFR; e HKI-272 e HKI-357, dois inibidores irreversíveis duais de EGFR e ERBB2. Figura 2C mostra geração de células NCI- HI650 resistentes a fármacos após tratamento com variadas concentrações de gefitinib ou o inibidor EKB-569 irreversível de ERBB. Colônias foram coloridas após 12 dias em cultura na presença de inibidores.

20

25

Figuras 3A-3D mostram dependência persistente em

sinalização de EGFR e ERBB2 em células resistentes a gefitinib, e passagem de tráfico alterada de receptor. Figura 3 A mostra viabilidade de células após abate mediado por siRNA de EGFR e ERBB2 em linhagens de células broncoalveolares com EGFR tipo selvagem (NCI-H1 666), comparado com células com a ativação de mutação de IE746-A750 em EGFR (NCI-H1 650) e dois derivados resistentes a gefitinib-(G7 e Cl 1). Células viáveis foram contadas 72 h após tratamento com RNA filamento duplo são mostradas como uma fração relativa a células tratadas com siRNA não específico, com desvios padrões com base em amostras em triplicata. Figura 3 B mostra inibição de autofosforilação de EGFR (Y1 068) e fosforilação de efetores AKT e MAPK a jusante (ERK) em células tratadas com concentrações crescentes de gefitinib ou o inibidor irreversível HKI-357, seguido por um pulso de 2-h com EGF. A linhagem parental de células NCI-H1 650 é comparada com uma linhagem resistente a gefitinib representativa, G7. Totais AKT e MAPK são mostrados como controles; tubulina é usada como controle de carga para os níveis de EGFR total, que estão no limite inferior de detecção nestas células. Figura 3 C mostra internalização de EGFR alterada em células NCI-H 1650 (G7) resistentes a gefitinib, comparado com a linhagem parental de células NCI-H1 650 sensível. EGF etiquetado com rodamina é usado para rotular EGFR a 5 e 20 min, após adição de ligando. A internalização aumentada de EGFR em células NCI-H1 650 (G7) é mais evidente a 20 min. (microscópio Zeiss, ampliação x63). Figura 3D mostra imunoblotting de EGFR internalizado de células parentais NCI-H1 650 e o

Derivado G7 resistente após rotulação com pulso de proteínas de superfície de células por biotinição e busca durante 20 min. O EGFR intracelular aumentado em células NCI-H1 650 (G7) é comparado com a internalização de receptor (TR) de transferrina não alterado.

Figuras 4A-4B mostram eficácia de inibidores de ERBB irreversíveis em supressão de mutante T790M EGFR. Figura 4A mostra

comparação de gefitinib e dois inibidores irreversíveis, HKI-357 e HKI-272, em sua capacidade para suprimir autofosforilação de EGFR (Y1 068) e fosforilação de efetores AKT e MAPK (ERK) a jusante na linhagem de células broncoalveolares NCI-H1 975, abrigando tanto uma mutação de sensibilização (L858R) como uma mutação associada com resistência (T790M). EGFR, AKT, e MAPK totais são mostrados como controles de carga . Figura 4B mostra supressão de proliferação em células NCI-H1 975 abrigando as mutações L858R e T790M por os três inibidores irreversíveis da família de ERBB, comparado com gefitinib.

5

10

Figura 5 mostra a seqüência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 2) e a seqüência de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de EGFR.

15

Figura 6 mostra que, como gefitinib, HKI 357 e EKB 569 (rotulados "Wyeth") demonstraram aumentado extermínio de células de células NSCLC abrigando uma mutação de EGFR, mas diferente de gefitinib, clones resistentes estes fármacos não foram prontamente gerados *in vitro* e eles retém sua eficácia contra clones resistentes a gefitinib.

**DESCRIÇÃO DETALHADA**

Cânceres resistentes a gefitinib e erlotinib

20

25

Gefitinib (composto ZD1 839 desenvolvido por AstraZeneca UK Ltd.; disponível sob o nome comercial IRESSA) e erlotinib (composto OSI-774 desenvolvido por Genentech, Inc. e OSI Pharmaceuticals, Inc.; disponível sob o nome comercial TARCEVA) induzem respostas clínicas dramáticas em casos de cânceres de pulmão de célula não pequena (NSCLCs) abrigando mutações ativantes no receptor EGF (EGFR) (1-3), que é marcado por estes inibidores competitivos de ligação de ATP (4, 5).A eficácia destes inibidores de tirosina quinase pode resultar tanto de alterações na fissura de ATP associada com estas mutações, que levam a uma melhorada inibição da quinase mutante por estes fármacos, e de dependência biológica destas células de câncer nos sinais de sobrevivência aumentada transduzidos para os

receptores mutantes, um fenômeno descrito como "vício de oncogene" (6, 7).

Apesar de respostas terapêuticas a tanto gefitinib como erlotinib poderem persistir durante tanto como 2-3 anos, a duração média de resposta na maior parte dos casos de NSCLC é somente de 6-8 meses (8-10).

5 Os mecanismos subjacentes à resistência adquirida ao fármaco não são bem entendidos. Por analogia com imatinib (GLEEVEC), que inibe a BCR-ABL quinase envolvida em leucemias mielóides crônicas (CMLs), a C-KIT quinase implicada em tumores estromais gastrointestinais (GISTs), e a FIP1L1 - PDGFR- $\alpha$  quinase em síndrome hipereosinofílica idiopática (HES), mutações

10 secundárias de domínio de quinase podem potencialmente suprimir a ligação do fármaco (11-16). No entanto, NSCLC recorrente não é prontamente submetida a biópsia, assim, somente amostras clínicas limitadas são disponíveis para análise. Recentemente, uma única mutação secundária,

15 T790M, dentro do domínio de EGFR quinase foi registrada em três de seis casos com doença recorrente após terapia com gefitinib ou erlotinib (17, 18).

Códon 315 de BCR- ABL, que é análogo a códon 790 de EGFR, é com freqüência mudado em CML resistente a imatinib (11, 12), e mutação do correspondente resíduo em C-XJr(COdOn 670) e FIP1L1-PDGFR- $\alpha$  (codon 674) é associado com GIST e HES resistentes a imatinib, respectivamente

20 (15, 16). A moldagem prematura *in vitro* de resistência a inibidores de EGFR indica que a mutação de codon 790 dentro de receptor de tipo selvagem deveria similarmente suprimir a inibição por um inibidor de tirosina quinase de EGFR (19). Recentemente, proteínas EGFR transfectadas contendo mutações ativantes junto com a substituição T790M foram mostradas como

25 demonstrando inibição reduzida por gefitinib e erlotinib (17, 18). Apesar da mutação T790M parecer contribuir para a resistência adquirida em alguns casos de NSCLC, os mecanismos subjacentes à falha do tratamento em casos faltando mutações de EGFR secundárias permanecem não explicados.

Em contraste com a quinase BCR-ABL citoplásmica,

sinalização por EGFR ligado a membrana envolve uma via complexa de ligação a ligando, homodimerização de receptor, e heterodimerização com ERBB2 e outros membros da família, seguido por internalização e reciclagem da do receptor ligado a ligando ou degradação do receptor mediada por ubiquitina (20). Significante sinalização dependente de EGF ocorre, como se pensa, durante o processo de internalização, que é também associado com a dissociação de complexos de EGFR no pH baixo de vesículas intracelulares. Como tal, fatores múltiplos modulam a resistência e qualidade do sinal transduzido pelo receptor, e alterações em passagem de tráfico de EGFR foram intimamente ligadas com a regulação de respostas celulares dependentes de EGF (20).

A presente invenção é baseada na descoberta de que cânceres resistentes a gefitinib podem incluir os em que a mutação de EGFR T790M está somente presente em um subconjunto de células de tumor resistentes e as em que a mutação T790M não é observada, mas internalização de EGFR aumentada é observada. A invenção é ainda baseada na descoberta de que inibidores de EGFR irreversíveis, que covalentemente reticulam o receptor, são efetivos para inibir cânceres com a mutação T790M e em cânceres com passagem de tráfico de EGFR alterado que podem tornar estes cânceres resistentes ao tratamento com gefitinib e/ou erlotinib. Assim, a presente invenção provê um método para tratamento de cânceres resistentes a gefitinib e/ou erlotinib compreendendo administrar inibidores de EGFR irreversíveis.

#### **Método para tratamento de um paciente**

Em uma forma de realização, a invenção provê um método para tratamento de câncer resistente a gefitinib/ erlotinib. Método compreende administrar a um paciente em necessidade deste tratamento uma quantidade efetiva de alguns inibidores de EGFR irreversíveis, incluindo EKB-569 (4-anilinoquinolina-3-carbonitrila; Greenberger et al., 11<sup>th</sup> NCI- EORTC-AACR Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, Amsterdam, November 7- 10,

2000, resumo 388; Wyeth), HKI-357 (um derivado de 4-anilinoquinolina-3-carbonitrila; Tsou et al. J. Med. Chem. 2005. 48: 1107-1131; Wyeth) e/ou HKI-272 (um derivado de 4-anilinoquinolina-3-carbonitrila; Rabindran et al., Cancer Res. 2004, 64, 3958-3965; Wyeth). Em uma forma de realização preferida, a invenção provê um método compreendendo administrar a um paciente em necessidade deste tratamento uma quantidade efetiva de EKB-569. Em uma forma de realização preferida, a invenção provê um método compreendendo administrar a um paciente em necessidade deste tratamento uma quantidade efetiva de HKI-357.

10 O tratamento também pode envolver uma combinação de tratamentos, incluindo, mas não limitados a inibidor de tirosina quinase em combinação com outros inibidores de tirosina quinase, quimioterapia, radiação, etc..

15 Os cânceres podem ser inicialmente diagnosticados como sensíveis a gefitinib/ erlotinib ou previstos como sendo sensíveis a gefitinib/ erlotinib por meio de métodos descritos em Lynch et al., 2004; 350:2129-2139. A sensibilidade a gefitinib/ erlotinib pode ser prevista pela presença no tumor de mutações de EGFR incluindo, por exemplo, deleção de resíduos 747 (lisina) a 749 (ácido glutâmico) combinada com a mutação em 750 (alanina), deleção de resíduos 747 (lisina) a 750 (alanina), substituição de arginina por leucina em resíduo 858, substituição de glutamina por leucina em resíduo 861.

20 Cânceres podem ser diagnosticados como resistentes a gefitinib/ erlotinib após tratamento com gefitinib e/ou erlotinib ter começado. Alternativamente, cânceres podem ser diagnosticados como resistentes a gefitinib/ erlotinib antes da iniciação de tratamento com estes compostos. A resistência a gefitinib e/ou erlotinib no tumor pode ocorrer após, por exemplo, 6 meses ou mais de tratamento com gefitinib e/ou erlotinib. Alternativamente, resistência a gefitinib e/ou erlotinib do tumor pode ser diagnóstica menos de 6

meses após tratamento com gefitinib e/ou erlotinib ter começado. Diagnóstico de resistência a gefitinib e/ou erlotinib pode ser obtido por meio de monitoração da progressão do tumor durante tratamento com gefitinib e/ou erlotinib. Progressão do tumor pode ser determinada por comparação do estado do tumor entre pontos no tempo após tratamento ter começado ou por comparação do estado do tumor entre um ponto no tempo após tratamento ter começado a um ponto no tempo antes da iniciação de tratamento com gefitinib e/ou erlotinib. Progressão do tumor pode ser monitorada durante tratamento com gefitinib e/ou erlotinib visualmente, por exemplo, por meio de radiografia, por exemplo, raio-X, varredura por CT, ou outros métodos de monitoração conhecidos do versado, incluindo palpitação do câncer ou métodos para monitor com biomarcador os níveis do tumor. Progressão do câncer durante tratamento com gefitinib e/ou erlotinib indica resistência a gefitinib e/ou erlotinib. Um aumento no nível dos biomarcadores de tumores indica progressão do tumor . Assim, um aumento nos níveis de biomarcadores de tumor durante tratamento com gefitinib e/ou erlotinib indica resistência a gefitinib e/ou erlotinib. Detecção de novos tumores ou detecção de metástase indica progressão do tumor . Cessação do encolhimento do tumor indica progressão do tumor . Crescimento do câncer é indicado por, por exemplo, aumento no tamanho do tumor, metástase ou detecção de um novo câncer, e/ou um aumento nos níveis de biomarcador de tumor.

O desenvolvimento de resistência a gefitinib e/ou erlotinib pode ser monitorada por meio de teste pela presença de uma mutação associada com a resistência a gefitinib e/ou erlotinib em células de tumor circulantes obtidas da circulação, ou outro fluido corporal, do indivíduo. Presença de mutações associadas com a resistência a gefitinib e/ou erlotinib em células de tumor do indivíduo é indicativa de um tumor resistente a gefitinib e/ou erlotinib.

Em uma forma de realização, o tumor do indivíduo abriga

mutações indicativas de sensibilidade a gefitinib e/ou erlotinib, ainda ele é resistente a tratamento com gefitinib e/ou erlotinib. Em uma forma de realização, o tumor do indivíduo abriga mutações indicativas de sensibilidade a gefitinib e/ou erlotinib e abriga mutações indicativas de resistência a gefitinib e/ou erlotinib, por exemplo, a mutação T790M, isto é, onde um resíduo metionina é substituído pelo resíduo de treonina nativo, em EGFR, por exemplo internalização de EGFR aumentada. Em uma forma de realização, O tumor do indivíduo não abriga mutações indicativas de sensibilidade a gefitinib e/ou erlotinib e de fato abriga mutações indicativas de resistência a gefitinib e/ou erlotinib, por exemplo, a mutação de T790M em EGFR, por exemplo, internalização de EGFR aumentada.

Em conexão com a administração do fármaco, uma "quantidade efetiva" indica uma quantidade que resulta em um efeito benéfico para pelo menos uma fração estatisticamente significativa de pacientes, como a melhora dos sintomas, uma cura, uma redução na carga da doença, redução da massa de massa de tumor ou números de células, extensão de vida, melhorada na qualidade de vida ou outro efeito geralmente reconhecido como positivo por doutores médicos familiarizados com o tratamento de um tipo particular de doença ou condição.

A dosagem efetiva de ingrediente ativo empregado pode variar dependendo do particular composto empregado, o modo de administração e a severidade da condição sendo tratada. O versado na arte conhece a dose efetiva para cada paciente, que pode variar com a severidade da doença, variação genética individual, ou taxa metabólica. No entanto, em geral, resultados satisfatórios são obtidos quando os compostos da invenção são administrados em um dosagem diária de cerca de 0,5 a cerca de 1000 mg/kg de peso corporal, opcionalmente dado em doses divididas duas a quatro vezes por dia, ou em uma forma de liberação prolongada. A dosagem diária total é projetada para ser de cerca de 1 a 1000 mg, preferivelmente de cerca de 2 a

500 mg. Formas de dosagem apropriadas para uso interno compreendem de cerca de 0,5 a 1000 mg do composto ativo em mistura íntima com um veículo farmacologicamente aceitável sólido ou líquido. Este regime de dosagem pode ser ajustado para prover a resposta terapêutica ótima. Por exemplo, varias doses divididas podem ser administradas diariamente ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

10 A via de administração pode ser intravenosa (I. V.), intramuscular (I.M.), subcutânea (S. C), intradérmica (I.D.), intraperitoneal (I.P.), intratecal (I.T.), intrapleural, intrauterina, retal, vaginal, tópica, intratumor e semelhantes. Os compostos da invenção podem ser administrados parenteralmente por injeção ou por infusão gradual com o tempo e pode ser distribuída por meios peristálticos.

15 Administração pode ser por meios transmucosais ou transdérmicos. Para administração transmucosal ou transdérmica, os agentes penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na formulação. Estes agentes penetrantes são geralmente conhecidos na arte e incluem, por exemplo, para administração transmucosal, sais de bile e derivado de ácido fusídico. Além disso, detergentes podem ser usados para facilitar a permeação. Administração transmucosal pode ser através de pulverização nasal, por exemplo, ou usando supositórios. Para administração oral, os compostos da invenção são formulados em formas de administração oral o convencionais como cápsulas, tabletes e tônicos.

25 Para administração tópica, a composição farmacêutica (inibidor de atividade quinase) é formulado em unguentos, pomadas, géis ou cremes, como é geralmente conhecido na arte.

As composições terapêuticas desta invenção, por exemplo inibidores de EGFR irreversíveis, são convencionalmente administradas intravenosamente, como por injeção em uma dose unitária, por exemplo. O

termo "dose unitária" quando usado em referência a uma composição terapêutica da presente invenção refere-se unidades fisicamente discretas apropriadas como dosagem unitária para o indivíduo, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o  
5 desejado efeito terapêutico em associação com os diluentes requerido; isto é, carreador, ou veículo.

As composições são administradas em um modo compatível com a formulação da dosagem, e em uma quantidade terapêuticamente efetiva. A quantidade a ser administrado e a escolha do tempo depende do  
10 indivíduo a ser tratado, a capacidade do sistema do indivíduo de utilizar o ingrediente ativo, e o grau de efeito terapêutico desejado. As quantidades precisas de ingrediente ativo requerido a ser administrado dependem do julgamento do médico clínico e são peculiares a cada indivíduo.

A composição terapêutica utilizável para praticar os métodos da presente invenção, por exemplo inibidores de EGFR irreversíveis, é descrita aqui. Qualquer formulação ou sistema de liberação de fármacos contendo os ingredientes ativos, que é apropriada para o uso pretendido, como  
15 são geralmente conhecidos dos versados, pode ser usada. Apropriados veículos farmacêuticamente aceitáveis para administração oral, retal, tópica ou parenteral (incluindo inalação, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa) são conhecidos dos versados. O veículo deve ser farmacêuticamente aceitável no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação e não deletérios para o seu recipiente.  
20

Como usado aqui, os termos "farmacêuticamente aceitável",  
25 "fisiologicamente tolerável" e suas variações gramaticais, como elas se referem às composições, veículos, diluentes e reagentes, são usados interpermutavelmente e representam que os materiais são capazes de administração a ou sobre um mamífero sem a produção de efeitos fisiológicos indesejáveis.

Formulações apropriadas para administração parenteral convenientemente incluem preparação aquosa estéril do composto ativo que é preferivelmente isotônico com o sangue do recipiente. Assim, estas formulações podem convenientemente conter água destilada, 5% dextrose em 5 água destilada ou solução salina. As formulações utilizáveis também incluem soluções concentradas ou sólidos contendo o composto que quando de diluição com um solvente apropriado dá uma solução apropriada para administração parental acima.

10 Para administração enteral, um composto pode ser incorporado em um veículo inerte em unidades discretas, como cápsulas, pílulas, tabletes ou pastilhas, cada contendo uma quantidade predeterminado do composto ativo; como um pó ou grânulos, ou uma suspensão ou solução em líquido aquoso ou líquido não aquoso, por exemplo, um xarope, um elixir, uma emulsão ou uma inalação. Os veículos apropriados podem ser amidos ou 15 açúcares e incluem lubrificantes, aromatizantes, aglutinantes, e outros materiais da mesma natureza.

Um tablete pode ser feito por compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Os tabletes comprimidos podem ser preparados por compressão em uma máquina 20 apropriada do composto ativo em uma forma de livre escoamento, por exemplo, um pó ou grânulos, opcionalmente misturados com ingredientes acessórios, por exemplo, aglutinantes, lubrificantes, diluentes inertes, agentes tensoativos ou dispersantes. Os tabletes moldados podem ser feitos por moldagem em uma máquina apropriada, uma mistura do composto ativo em 25 pó com qualquer veículo apropriado.

Um xarope ou suspensão pode ser feito pela adição do composto ativo a um concentrado, solução aquosa de um açúcar, por exemplo, sacarose, ao qual também pode ser adicionado quaisquer ingredientes adicionais. Estes ingredientes adicionais podem incluir,

aromatizante, um agente para retardar cristalização do açúcar ou um agente para aumentar a solubilidade de qualquer outro ingrediente, por exemplo, como um álcool poliídrico, por exemplo, glicerol ou sorbitol.

5 As formulações para administração retal podem ser apresentadas como um supositório com um veículo convencional, por exemplo, manteiga de cacau ou Witepsol S55 (marca registrada de Dynamite Nobel Chemical, Germany), para uma base de supositório.

10 Formulações para administração oral podem ser apresentadas como um melhorador. Os melhoradores de absorção oralmente aceitáveis incluem tensoativos como lauril sulfato de sódio, palmitoil carnitina, Lauret-9, fosfatidilcolina, ciclodextrina e seus derivados, sais de bile como deoxicolato de sódio, taurocolato de sódio, glicolato de sódio, e fusidato de sódio; agentes quelantes incluindo EDTA, ácido cítrico e salicilatos; e ácidos graxos (por exemplo, ácido oleico, ácido laurico, acilcarnitinas, mono- e 15 diglicetídeos). Outros melhoradores de absorção oral incluem cloreto benzalcônio, cloreto de benzetônio, CHAPS (3- (3-colamidopropil)-dimetilamonio-1-propanossulfonato), Big-CHAPS (N, N-bis(3-D-gluconamidopropil)-colamida), clorobutanol, octoxinol-9, álcool benzílico, fenóis, cresóis e álcoois de alquila. Um melhorador de absorção preferido 20 para a presente invenção é lauril sulfato de sódio.

Alternativamente, o composto pode ser administrado em lipossomas ou microesferas (ou micropartículas). Métodos para preparar lipossomas e microesferas para administração a um paciente são bem conhecidos dos versados. Patente U.S. 4,789,734, cujos conteúdos são aqui 25 incorporados por referência, descreve métodos para encapsular materiais biológicos em lipossomas. Essencialmente, o material é dissolvido em uma solução aquosa, os fosfolipídeos e lipídeos apropriados adicionados, junto com tensoativos se requerido, e o material dialisado ou sonicado, como necessário. Um estudo dos métodos conhecidos é provido por G. Gregoriadis,

Cap. 14, "Liposomes," *Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp. 287-341 (Academic Press, 1979).

Microesferas formadas de polímeros ou proteínas são bem conhecidas dos versados na arte, e pode ser adequadas para passagem através do trato gastrointestinal diretamente na corrente sanguínea. Alternativamente, o composto pode ser incorporado e as microesferas, ou compósito de microesferas, implantadas para uma liberação lenta durante um período de tempo na faixa de dias a meses. Ver, por exemplo, Patentes U.S. 4.906.474, 4.925.673 e 3.625.214, e Jein, *TIPS* 19:155-157 (1998), cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

Em uma forma de realização, o inibidor de tirosina quinase da presente invenção pode ser formulado em um lipossoma ou micropartícula que é dimensionada de modo apropriado para se alojar nos leitos capilares após administração intravenosa. Quando o lipossoma ou micropartícula é alojado nos leitos capilares circundando o tecido isquêmico, os agentes podem ser administrados localmente no sítio em que eles podem ser mais efetivos. Os lipossomas apropriados para marcação do tecido isquêmico são geralmente menos que cerca de 200 nanômetros e são também tipicamente vesículas unilamelares, como descrito, por exemplo, em Patente U.S. 5.593.688 para Baldescliweiler, "Liposomal targeting of ischemic tissue," cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

As micropartículas preferidas são as preparadas a partir de polímeros biodegradáveis, como poliglicolídeos, polilactídeos e seus copolímero. Os versados na arte podem prontamente determinar um sistema veículo apropriado dependendo de vários fatores, incluindo a taxa desejada de liberação de fármaco e a dosagem desejada.

Em uma forma de realização, as formulações são administradas via cateter diretamente no interior dos vasos sanguíneos. A administração pode ocorrer, por exemplo, através de furos no cateter. Nestas

formas de realização em que os compostos ativos tem uma meia vida relação longa (da ordem de 1 dia a uma semana ou mais), as formulações podem ser incluídas em hidrogéis poliméricos biodegradáveis, como os descritos em Patente U.S. 5.410.016 para Hubbell et al. Estes hidrogéis poliméricos podem ser liberados no interior de um lúmen de tecido e os compostos ativos liberados com o tempo à medida que o polímero degrada. Se desejável, os hidrogéis poliméricos podem ter micropartículas ou lipossomas que incluem os compostos dispersos no mesmo, provendo outro

mecanismo para a liberação controlada dos compostos ativos.

10 As formulações podem ser convenientemente apresentadas em uma forma de dosagem unitária e podem ser preparados por qualquer dos métodos bem conhecidos na arte de farmácia. Todos os métodos incluem a etapa de levar o composto ativo em associação com um veículo r que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas por levando de modo uniforme e íntima do composto ativo em associação com um veículo líquido ou um veículo sólido finamente dividido e então, se necessário, moldando o produto na forma de dosagem unitária desejada.

15 As formulações podem ainda incluir um ou mais ingrediente(s) acessório(s) usados na arte de formulações farmacêuticas, por exemplo, diluente, tampões, agentes aromatizantes, aglutinantes, agentes tensoativos, espessantes, lubrificantes, agentes de suspensão, conservantes (incluindo antioxidantes) e semelhantes.

20 Compostos dos presentes métodos (isto é inibidores de EGFR irreversíveis) podem ser apresentados para administração ao trato respiratório como uma baforada ou um aerossol ou solução para um nebulizador, ou como 25 um pó microfino para insuflação, sozinho ou em combinação com veículo inerte como lactose. Em tal caso, as partículas de composto ativo tem de modo apropriado diâmetros de menos que 50 microns, preferivelmente menos que 10 microns, mais preferivelmente entre 2 e 5 microns.

Geralmente, para administração nasal, um pH suavemente ácido será preferidos. Preferivelmente, as composições da invenção tem um pH de cerca de 3 a 5, mais preferivelmente de cerca de 3.5 a cerca de 3.9 e mais preferivelmente 3.7. O ajuste do pH é obtido por adição de um ácido apropriado, como ácido clorídrico.

10 A preparação de uma composição farmacológica que contém ingredientes ativos dissolvidos ou dispersos nos mesmos é bem conhecida na arte e não precisada ser limitada com base em formulação. Tipicamente estas composições são preparadas como injetáveis ou como soluções líquidas ou suspensões, no entanto, formas sólidas apropriadas para solução, ou suspensões, em líquido antes do uso também podem ser preparadas. A preparação também pode ser emulsificada.

15 O ingrediente ativo pode ser misturado com excipientes que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo e em quantidades apropriadas para uso nos métodos terapêuticos descritos aqui. Excipientes apropriados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e suas combinações. Além disso, se desejado, a composição pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes de tampão de pH e  
20 semelhantes que melhoram a eficácia do ingrediente ativo.

Os inibidores de quinase irreversíveis da presente invenção podem incluir sais farmacologicamente aceitáveis dos componentes aqui apresentados. Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres do polipeptídeo), que são  
25 formados com ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou como ácidos orgânicos, como acético, tartárico, mandélico e semelhantes. Sais formados com os grupos carboxila livres podem ser também derivados de bases inorgânicas como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amônio, cálcio ou férrico, e como bases orgânicas como

isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina e semelhantes.

Os veículos fisiologicamente toleráveis são bem conhecidos na arte. Exemplos de veículos líquidos são soluções aquosas estéreis que não contém materiais além dos ingredientes ativos e água, ou contém um tampão como fosfato de sódio em valor de pH fisiológico, solução salina fisiológica ou ambos, como solução salina tamponada com fosfato. Ainda mais, os veículos aquosos podem conter mais de um sal tampão, assim como sais como cloretos de sódio e potássio, dextrose, polietileno glicol e outros solutos. .

As composições líquidas também podem conter fases líquidas além de e em exclusão de água. Exemplos destas fases de líquido adicionais são glicerina, óleos vegetais como óleo de semente de algodão, e emulsões água-óleo.

15 **Definições:**

Os termos "ErbB 1 ", "receptor de fator de crescimento epidérmico" e "EGFR" são usados interpermutavelmente aqui e referem-se a EGFR de seqüência nativa, como descrito, por exemplo, em Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), incluindo suas variantes (por exemplo a EGFR mutante de deleção como em Humphrey et al. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). erbB1 refere-se ao gene codificando o produto de proteína EGFR. Como usado aqui, a proteína EGFR é descrita como GenBank número de acesso. NP\_005219 (SEQ ID NO: 1) que é codificado por gene erbB1, GenBank número de acesso. NM\_005228 (SEQ ID NO: 2). Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de erbB1 /EGFR podem ser encontradas na Figura 5.

O termo " atividade de quinase aumentando a variância de ácido nucleico" como usado aqui refere-se a uma variância (isto é mutação) em uma seqüência de nucleotídeos de um gene que resulta em uma aumentada

atividade de quinase. A aumentada atividade de quinase é um resultado direto da variância no ácido nucleico e está associada com a proteína para a qual o gene codifica.

5 O termo "fármaco " ou "composto" como usado aqui refere-se a uma entidade química ou produto biológico, ou combinação de entidades químicas ou produtos biológicos, administrados a uma pessoa para tratar ou evitar ou controlar a doença ou condição. A entidade química ou produto biológico é preferivelmente, mas não necessariamente um composto de baixo peso molecular, mas também pode ser um composto maior, por exemplo, um 10 oligômero de ácidos nucleicos, aminoácidos, ou carboidratos, incluindo sem limitação, proteínas, oligonucleotídeos, ribozimas, DNAsimas, glicoproteínas, siRNAs, lipoproteínas, aptâmeros, e suas modificações e combinações.

Como usado aqui, os termos "efetivo" e "eficácia " incluem tanto eficácia farmacológica como segurança fisiológica. A eficácia 15 farmacológica refere-se a capacidade do tratamento resultar em um efeito biológico desejado no paciente. A segurança fisiológica refere-se ao nível de toxicidade, ou outros efeitos fisiológicos adversos em nível celular, órgão e/ou organismo (com freqüência referidos como efeitos laterais) resultando da administração do tratamento. "Menos efetivo" significa que os resultados de 20 tratamento em um nível menor terapeuticamente significante de eficácia farmacológica e/ou um nível terapeuticamente maior de efeitos fisiológicos adversos.

Moléculas de ácido nucléico podem ser isoladas de uma amostra biológica particular, usando qualquer um dentre vários 25 procedimentos, que são bem conhecidos na arte, o procedimento de isolamento particular selecionado sendo apropriado para a amostra biológica particular. Por exemplo, procedimentos de congelamento descongelamento e lise alcalina podem ser utilizáveis para obter moléculas de ácido nucléico a partir de materiais sólidos; procedimentos de calor e lise alcalina podem ser

utilizáveis para obter moléculas de ácido nucléico a partir de urina; e extração de proteinase K pode ser usada para obter ácido nucleico a partir de sangue (Rolff, A et al. PCR: Clinical Diagnostics and Research, Springer (1994).

5 Como usado aqui, um "câncer" em um indivíduo ou paciente refere-se a presença de células possuindo características de células típicas causadoras de câncer, como proliferação descontrolada, imortalidade, potencial metastático, crescimento rápido e taxa de proliferação, e alguns aspectos morfológicos característicos. Em algumas circunstâncias, as células de câncer não terão a forma de um tumor, ou estas células podem existir localmente dentro de um animal, ou circular na corrente sanguínea como células independentes.

**EXEMPLOS**

15 **Compostos.** Compostos usados aqui, incluindo EKB-569, HK1-357, e HK1-272 como descritos em Patente U.S. 6,002,008; Greenberger et al, Proc. 11<sup>th</sup> NCI EORTC-AACR Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, Clinical Cancer Res. Vol. 6 Supplement, Nov. 2000, ISSN 1078-0432; em Rabindran et al., Cancer Res. 64: 3958- 3965 (2004); Holbro e Hynes, Ann. Rev. Pharm. Tox. 44:195-217 (2004); e Tejpar et al., J. Clin. Oncol. ASCO Annual Meeting Proc. Vol. 22, No. 14S: 3579 (2004).

20 **Análise de NSCLC Recorrente e Geração de Células NCI-H1 650 Resistentes a Gefitinib.** Amostras clínicas de NSCLC recorrente foram obtidas após autópsia após aprovação apropriada. Todo o domínio quinase de EGFR foi seqüenciado após análise de produtos PCR não clonados. Múltiplos clones de exon 20 foram seqüenciados para examinar codon 790. Análise mutacional de *EGFR* (exons 1-28), *ERBB2* (exons 1-24), *PTEN*(*Q*exons 1-9), *Kras* (codons 12, 13, e 61), e *p53* (exons 5-8) em clones resistentes a gefitinib assim como a linhagem de células parental NCI-H1650 foi realizada por seqüenciamento automatizado de exons individuais e flaqueamento da seqüência intrônica (condições PCR disponíveis em

solicitação) com seqüenciamento bidirecional por uso de química de terminador de corante (BIGDYE versão 1.1, Applied Biosystems). Reações de seqüenciamento foram cicladas em um sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems), e electroferogramas foram analisados usando software SEQUENCE NAVIGATOR e FACTURA (Applied Biosystems).

Para gerar subclones resistentes de células NCI-H1 650, estas foram tratadas com etil metano sulfonato (EMS; 600 µg/ml), deixadas recuperar durante 72 h, e então semeadas em uma densidade de 6 x 10<sup>4</sup> células por disco de 10-cm<sup>2</sup> em 20 µM gefitinib. Resistência relativa destas células a gefitinib, comparado com os inibidores irreversíveis, foi obtida por semeadura de 5 x 10<sup>4</sup> células em placas de seis cavidades em 5% FCS e 100 ng/ml EGF (Sigma), na presença de concentrações variadas de fármacos, seguido após 72 h por fixação das células com 4% formaldeído, coloração com 0,1% violeta cristal, e quantificação da massa de células usando o Sistema de formação de imagem infra-vermelho Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Para experimentos de abate de RNA interferência pequeno (siRNA), células foram transfectadas com oligonucleotídeos de RNA filamento duplo marcando EGFR, ERBB2 (ambos SMARTpool de Dharmacon, Lafayette, CO), ou controle não específico (LRTIB), usando reagente de transfecção X-treme GENE (Roche Applied Science). Após 72 h, células foram coloridas com violeta cristal e analisadas no varredor de infra-vermelho Odyssey.

**Estudos de Immunoblotting e Sinalização.** Inibição de sinalização de EGFR por concentrações crescentes de gefitinib ou os inibidores irreversíveis foi determinada por semeadura de 9 x 10 células em placas de 24 cavidades, adicionando os fármacos ao meio contendo 5% FCS durante 15 min, seguido por um pulso de 2 horas com 100 ng/ml EGF, e coletando os lisados. Os lisados foram preparados em tampão de carga 2x gel, sonicados, fervidos e então separados por 10% SDS/PAGE, seguido por

eletrotransferência a membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), e imunoblotting. Anticorpos usados foram fosfo-EGFR Y1 068 e proteína quinase ativada por fosfo-mitogênio (MAPK) (Cell signalling Technology, Beverly, MA), fosfo-AKT (BioSource International, Camarillo, CA), e EGFR, MAPK, AKT, e tubulina totais (Santa Cruz Biotechnology).

**Análise de Internalização de EGFR.** Para demonstrar a internalização de EGFR por microscopia de fluorescência, células foram cultivadas em tampas e incubadas com 1 ng/ml (rh) EGF humano recombinante (Molecular Probes, Eugene, OR) para vários intervalos antes de fixar em 4% paraformaldeído durante 10 min. As tampas foram lavadas em PBS e montadas com reagente anti-desbotamento ProLong Gold (Molecular Probes). Para quantificar a internalização de EGFR por biotinylation de superfície de células, células foram cultivadas até confluência, pré-tratadas com ciclo-hexamida, incubadas em gelo durante 1 h com 1,5 mg/ml sulfossuccinimidil-2-(biotinamido)etil-1,3-ditiopropionato (sulfo-NHS-SS-biotina; Pierce), e lavados com tampão de bloqueio (50 nM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ /1 mM  $\text{MgCl}_2$ ·A).1 mM  $\text{CaCl}_2$  em PBS) para extinguir sulfo-NHS-SS-biotina livre, seguido por várias outras lavagens com PBS. As células foram então incubadas em meio de cultura a 37°C por vários intervalos para permitir a internalização das moléculas biotiniladas, lavadas duas vezes durante 20 min em uma solução de glutatona (50 mM glutatona/75 mM NaCl/75 mM NaOH/1% BSA) em gelo para extrair todos os grupos biotinila da superfície da célula, e então raspados e lisados em 500  $\mu\text{M}$  tampão de teste de radioimunoprecipitação (RIPA) (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, com 150 mM NaCl/0,1% SDS/1% Triton X-100) suplementado com NaF, Na-orto vanadato, e inibidores de protease. Extratos de células foram centrifugados, e os sobrenadantes foram incubados com contas de estreptavidina (Sigma) para coletar as proteínas biotiniladas, que foram então analisadas por SDS/PAGE e imunoblotting com anticorpo anti-EGFR (SC-03, Santa Cruz Biotechnology)

ou anticorpo contra receptor de transferrina (Santa Cruz Biotechnology).

### Resultados e Discussão

#### **Análise de cânceres recorrentes de pulmão com resistência adquirida a gefitinib.**

5 em dois pacientes cujos tumores tinham abrigado uma mutação ativante de EGFR quinase no momento do diagnóstico e que tinham mostrado uma resposta clínica inicial dramática ao fármaco (1). Em ambos os casos, doença metastático progressiva no fígado levou à morte dos pacientes, 1-2 anos após iniciação de tratamento. Em caso 1, análise da metástase principal do fígado  
10 obtida no momento da autópsia indicou persistência da mutação *EGFR* sensibilizante (L858R), assim como a presença de uma mutação T790M recentemente adquirida (Fig. IA). De modo interessante, análise de produtos PCR não clonados mostrou a mutação L858R inicial como estando presente em uma abundancia consistente com uma mutação heterozigótica que está  
15 presente em todas as células de tumor, enquanto a mutação T790M secundária foi vista em aproximadamente um quinto da abundancia do alelo de tipo selvagem correspondente. Assim, esta mutação associada com resistência parece estar presente em somente a fração de células dentro do tumor recorrente.

20 Caso 2 envolveu oito distintas metástases recorrentes no fígado após a falha da terapia com gefitinib. Em todas estas lesões independentes, a mutação de *EGFR* L861Q sensibilizante estava presente na relação esperada para uma mutação heterozigótica. Não foi detectável uma mutação *EGFR* secundária por análise de produtos PCR não clonados de  
25 qualquer uma destas metástases. No entanto, após subclonagem dos produtos PCR, a mutação T790M foi verificada como estando presente em uma frequência muito baixa em dois dos quatro tumores metastático analisados (T790M, 2 de 50 clones seqüenciados da lesão 1 e 1 de 56 da lesão 2), mas não das duas outras metástases recorrentes (0 de 55 clones da lesão 3 e 0 de

59 da lesão 4), ou o tumor primário (0 de 75 clones) (Fig. W e Tabela 1). Tomados juntos, estes resultados são consistentes com relatos anteriores de que a mutação T790M está presente em alguns, mas não todos, os casos de resistência adquirida a gefitinib (três de sete tumores; ver refs. 17, 18, e 21).

5 Além disso, como previamente notado (18), mesmo em alguns casos com esta mutação associada a resistência, ela parece estar presente em somente uma pequena fração de células de tumor dentro de uma lesão recorrente. Estas observações sugerem que adicionais mecanismos de resistência estão envolvidos em casos sem uma mutação *EGFR* secundária e que estes mecanismos coexistem com a mutação T790M em outros casos.

**Geração de linhagens de células resistentes a gefitinib com**

**susceptibilidade a inibidores irreversíveis.** Dada a excelente correlação

entre a responsividade clínica de NSCLC mutante de EGFR e a melhorada

sensibilidade a gefitinib de linhagens de células NSCLC com estas mutações

15 (2, 6, 22, 23), e a limitada disponibilidade de amostras clínicas dos pacientes com relapso, os requerentes modelaram a resistência a gefitinib *in vitro*. Os

requerentes cultivaram a linhagem de células de câncer broncoalveolar NCI-

H1 650, que tem uma deleção *in-frame* de quinase EGFR (delE746-A750), em

20 20 µM gefitinib, com ou sem exposição anterior ao mutagene etil metano

sulfonato. Esta linhagem de células demonstra um aumento de 100 vezes na

sensibilidade a gefitinib, comparado com algumas linhagens de NSCLC

expressando EGFR tipo selvagem (6). Apesar da vasta maioria destas células

serem efetivamente mortas por 20 µM gefitinib, colônias resistentes ao

fármaco foram prontamente observadas em uma frequência de  $\sim 10^{-5}$ , sem

25 levar em conta o tratamento com o mutagene. Quarenta e nove clones

resistentes ao fármaco independentes foram isolados, mostrando uma

diminuição média de 50 vezes em sensibilidade a gefitinib (Fig. 2A). Todos

estes mostraram uma persistência da mutação sensibilizante sem expressão

alterada de EGFR, e nenhum tinha adquirido uma mutação *EGFR* secundária

ou novas mutações em *ERBB2*, *p53*, *Kras*, ou *PTEN*. Clones resistentes a gefitinib demonstraram comparável resistência a inibidores relacionados da classe de anilinoquinazolina. Notavelmente, no entanto, eles mostraram uma persistente sensibilidade a três inibidores de família ERBB (Fig. 2A): HKI-272 (24) e HKI-357 (composto 7f em ref. 25), que são inibidores duais de EGFR e ERBB2 (valores  $IC_{50}$  de 92 e 34 nM, respectivamente, para EGFR e 59 e 33 nM, respectivamente, para ERBB2), e EKB-569 (26), um inibidor seletivo de EGFR (valores  $IC_{50}$  de 39 nM para EGFR e 1,3  $\mu$ M para ERBB2) (Wyeth) (Fig. 2B). Todos os três fármacos são inibidores irreversíveis, mais provavelmente via uma ligação covalente com o resíduo cys797 dentro do domínio catalítico de EGFR ou o cys805 de ERBB2. Como gefitinib, estes compostos demonstram aumentada morte de células NSCLC abrigando uma mutação EGFR, comparado com células expressando receptor tipo selvagem (Fig. 2A). No entanto, em contraste com gefitinib, contra o qual os clones resistentes são prontamente gerados, mesmo em concentrações elevadas do fármaco, os requerentes foram incapazes de estabelecer clones de células que foram resistentes aos inibidores irreversíveis em concentrações acima de 10  $\mu$ M, mesmo após a mutagenese com etil metano sulfonato (Fig. 2C).

**Dependência de células resistentes a gefitinib em expressão de EGFR e ERBB2.** Para adquirir um esclarecimento sobre os mecanismos subjacentes à aquisição de resistência a gefitinib e a sensibilidade persistente aos inibidores irreversíveis, os requerentes primeiro determinaram se as linhagens de células resistentes permanecem dependentes de EGFR para sua viabilidade. Os requerentes mostraram previamente que o abate mediado por siRNA de EGFR dispara a apoptose em células abrigando EGFRs mutantes, mas não nos alelos de tipo selvagem (6). Significativamente, células NCI-H1650 parentais, assim como seus derivados resistentes a gefitinib mostraram uma redução comparável em viabilidade de células após transfecção com EGFR marcando siRNA (Fig. 3A). Assim, a aquisição de resistência a

gefitinib não envolve a ativação independente de EGFR de efetores a montante. Porque HKI-272 e HKI-357 marcam tanto EGFR como ERBB2, os requerentes também testaram a supressão deste receptor relacionado. O abate de ERBB2 em NCI-H1 650 e seus derivados resistentes a gefitinib também causaram perda de viabilidade (Fig. 3A), sugerindo um papel para heterodímeros EGFR-ERBB2 na transdução dos sinais de sobrevivência essenciais em células de tumor abrigando mutações *EGFR*. Inibição de *EGFR* sozinho por um inibidor irreversível parece ser suficiente para induzir apoptose em células resistentes a gefitinib, como demonstrado pela eficácia de EKB-569, que primariamente marca EGFR (26). No entanto, dados os efeitos potencialmente complementares de marcação tanto de EGFR como de ERBB2 por uso de siRNA e a disponibilidade de inibidores irreversíveis que marcam ambos estes membros da família, o benefício potencial da inibição dual certifica esta consideração.

Os requerentes compararam a capacidade de gefitinib e inibidores irreversíveis da família ERBB como suprimindo a sinalização via efetores a montante de EGFR que mediam suas vias proliferativas e de sobrevivência. HKI-357 foi 10 vezes mais efetivo do que gefitinib na supressão de autofosforilação de EGFR (medido em resíduo Y 1068), e fosforilação de AKT e MAPK em células NCI-H1 650 parentais abrigando a mutação de EGFR delE746-A750 (Fig. 3B). Em um derivado resistente a gefitinib, NCI-H1650(G7), gefitinib demonstrou uma eficácia consideravelmente reduzida na supressão da fosforilação de AKT, um efetor de sinalização de EGFR chave, ligado a responsividade a gefitinib (6), enquanto HKI-357 demonstrou uma atividade persistente (Fig. 3B).

**Internalização de EGFR alterada em genes resistentes a Gefitinib.** Dada a ausência de mutações secundárias em EGFR e a persistente susceptibilidade de células resistentes a gefitinib para a supressão mediada por siRNA de EGFR, os requerentes testaram se os mecanismos subjacentes à

inibição diferencial de sinalização de EGFR em células resistentes a gefitinib por inibidores reversíveis e irreversíveis podem estar correlacionados com alterações em tráfico de receptores, a um modulador bem documentado de sinalização dependente de EGFR (20). De fato, análise de tráfico de EGFR em células resistentes derivadas de NCI-H1 650- demonstrou um consistente aumento em internalização de EGFR, comparado com as células parentais sensíveis a fármaco, como medido tanto por internalização de EGF rotulado com fluoresceína (fig. 3C) como quantificação de EGFR citoplásmico biotinilado (Fig. 3D). Não foi observado tal efeito com o receptor de transferrina, sugerindo que isto não resulta de uma alteração generalizada em todo o processamento do receptor. Apesar de outro trabalho ser requerido para definir o mecanismo preciso para esta alteração do tráfico de EGFR, um processo complexo em numerosas proteínas regulatórias foram implicadas, estes resultados sugerem que a capacidade de gefitinib para inibir a ativação de EGFR está comprometida nestas células, enquanto a ação dos inibidores irreversíveis não foi afetada de modo detectável.

**Inibição de sinalização de EGFR T790M e melhorado extermínio de células por inibidores irreversíveis.** A melhorada supressão de sinalização EGFR por ERBB inibidores irreversíveis criou a possibilidade de que estes fármacos também podem demonstrar persistente atividade no contexto de células abrigando a mutação secundária T790M em EGFR. Os requerentes assim testaram os efeitos destes inibidores em linhagem de células NCI-H1 975 de câncer broncoalveolar, que abriga tanto mutações L858R como T790M em EGFR (18). Significativamente, esta linhagem de células foi derivada de um paciente que não tinha sido tratado com um inibidor de EGFR, indicando que esta mutação não é apenas associada com resistência adquirida ao fármaco. Tanto HKI-357 como HKI-272 foram consideravelmente mais efetivos do que gefitinib em supressão de autofosforilação de EGFR induzida por ligando e sua sinalização a montante,

como determinado por fosforilação de AKT e MAPK (Fig. AA). Similarmente, todos os três inibidores irreversíveis suprimiram proliferação nesta linhagem de células sob condições onde é resistente a gefitinib (Fig. 4B). Assim, inibidores irreversíveis de ERBB parecem ser efetivos em células abrigando o EGFR T790M assim como em células com tráfico alterado do receptor de tipo selvagem.

5

Os resultados dos requerentes confirmam o relato de mutações de T790M em EGFR como mutações secundárias que surgem em NSCLCs previamente sensíveis abrigando uma mutação ativante, associado com a emergência de resistência adquirida (17, 18). No entanto, esta mutação é presente somente em um subconjunto de casos, e mesmo tumores que abrigam a mutação T790M podem conter somente uma fração pequena de células com esta mutação. Estas observações implicam que os mecanismos de resistência múltipla podem coexistir em tumores recorrentes após uma resposta inicial a gefitinib ou inibidores reversíveis similares de EGFRs. Além disso, estas descobertas sugerem que mecanismos de resistência independentes de T790M podem ser igualmente, se não mais, efetivos do que a própria substituição de T790M para conferir resistência ao fármaco e podem explicar porque os tumores recorrentes raramente demonstram clonalidade para T790M (17, 18). Mecanismos *in vitro* de resistência adquirida a gefitinib não envolvem mutações de EGFR secundárias em uma frequência significativa, mas ao contrário estão correlacionados com alterada passagem de tráfico do receptor. No entanto, deve ser notado que os requerentes não examinaram a passagem de tráfico de EGFR em todos os clones resistentes que os requerentes estabeleceram *in vitro*, e permanece possível que mecanismos adicionais podem contribuir para a resistência a gefitinib em alguns dos clones. Mesmo assim, virtualmente todos os clones resistentes a gefitinib demonstraram uma sensibilidade comparável aos inibidores de ERBB irreversíveis.

10

15

20

25

Os resultados dos requerentes indicam diferenças marcantes entres os inibidores competitivos de EGFR como gefitinib, cuja eficácia é limitada para o desenvolvimento rápido de resistência ao fármaco *in vitro*, e inibidores irreversíveis, em que resistência adquirida parece ser rara (Fig. 2C).

5 Os requerentes especulam que a internalização aumentada de EGFR ligado a ligando em células resistentes pode estar ligada à dissociação do complexo gefitinib—EGFR no pH baixo de vesículas intracelulares. Em contraste, reticulação irreversível do receptor não deve ser afetada por estas alterações na passagem do tráfico de receptor. Resistência adquirida a gefitinib é

10 estavelmente mantida após passagem de células por até 20 gerações na ausência do fármaco, sugerindo que alterações genéticas ou epigenéticas em genes que modulam virada de EGFR podem estar subjacentes a este fenômeno. Porque a passagem de tráfico do receptor não pode ser prontamente estudada por uso de amostras clínicas disponíveis, a

15 identificação destas alterações genômicas pode ser requerida antes das correlações clínicas serem possíveis. Mesmo assim, este mecanismo pode contribuir para a resistência a gefitinib adquirida *in vivo* em pacientes com doença recorrente que não apresentam mutações secundárias em EGFR.

Inibidores de ERBB irreversíveis também parecem ser

20 efetivos para superar resistência a gefitinib mediada pela mutação T790M, um efeito que provavelmente resulta da preservação de ligação do inibidor apesar da alteração deste resíduo crítico.. Apesar deste trabalho estar em progresso, outro inibidor irreversível de EGFR [CL-387,785, Calbiochem (27)]foi mostrado como inibindo a atividade quinase de mutante de EGFR T790M

25 (17). A eficácia de CL-387,785 no contexto de T790M foi proposta para resultar da ausência de um cloreto na posição 3 do grupo anilina, que está presente em gefitinib e foi postulada como interferindo estéreo-quimicamente com a ligação ao mutante metionina em codon 790. No entanto, EKB-569, HKI-272, e HKI-357 tem, todos, porções cloreto na posição no anel anilina,

sugerindo que sua capacidade compartilhada para ligar irreversivelmente a EGFR é provavelmente para explicar sua eficácia, em vez da ausência de uma interação estereo-química específica com T790M (24-26). Assim, estes inibidores irreversíveis podem demonstrar ser amplamente efetivos para evitar  
5 vários mecanismos de resistência, além da mutação T790M.

**Tabela 1.** Presença de mutação EGFR T790M em uma frequência muito baixa em tumores recorrentes do caso 2

Tumor	No. de clones	
	Mutante T790M	Tipo selvagem
Primário	0	75
Recorrente 1	2	48
Recorrente 2	1	55
Recorrente 3	0	55
Recorrente 4	0	59

O seqüenciamento de números grandes de produtos PCR clonados revelou que uma minoria de alelos dentro de duas de quatro lesões  
10 no fígado contém a mutação T790M.

As referências citadas em todo o pedido são incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

## REFERÊNCIAS

1. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of  
15 four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. N Engl J Med 2002; 346:92- 98.
2. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2001;344:1031-1037.
- 20 3. Arteaga CL. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. Exp Cell Res. 2003; 284:122-30.
4. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. Exp Cell Res 2003;284:31-53
- 25 5. Luetkeke NC, Phillips HK , Qui TH, Copeland NG, Earp

HS, Jenkins NA, Lee DC. The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev* 1994;8:399-413.

6. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37:S9-15

5 7. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:2965- 2969.

10 8. Ciesielski MJ, Genstermaker RA. Oncogenic epidermal growth factor receptor mutants with tandem duplication: gene structure and effects on receptor function. *Oncogene* 2000; 19:810-820.

9. Frederick L, Wang W-Y, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000; 60:1383-1387.

15 10. Huang H-JS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997;272:2927-2935

20 11. Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res* 2000; 103:57- 75.

12. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2958-2970

25 13. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR et al. ZD 1839 (Iressa) : An orally active inhibitor of Epidermal Growth Factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002;62:5749-5754.

14. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine

kinase inhibitor ZDl 839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001;61:8887-8895.

15. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N. The tyrosine kinase inhibitor ZDl 839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER-2 overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 2001 ;61 :7184-7188.

10 16. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, et al. ZDl 839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 2240-2250.

17. Herbst RS, Maddox A-M, Rothernberg ML, et al. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZDl 839 is generally well tolerated and has activity in non-small cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol.* 2002;20:3815-3825.

15 18. Baselga J, Rischin JB, Ranson M, et al. Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of ZD 1839, a selective oral Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin One* 2002;20:4292-4302.

20 19. Albanell J, Rojo F, Averbuch S. et al. Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZDl 839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J Clin Oncol.* 2001; 20:110-124.

25 20. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of Gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: A randomized trial. *JAMA* 2003,290:2149-2158.

21. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003 ;21 :2237-2246.

22. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;22:777-784.

5 23. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A phase III trial — INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;22:785-794.

24. Rich JN, Reardon DA, Peery T, et al. Phase II Trial of Gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2004;22:133-142

10 25. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD1839;Iressa) Tablets. *Clin Cancer Res.* 2004;10:1212-1218.

15 26. Cappuzzo F, Gregorc V, Rossi E. et al. Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): Analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or Metastatic NSCLC. *J Clin Oncol.* 2003 ;21:2658-2663.

27. Fitch KR, McGowan KA, van Raamsdonk CD, et al. Genetics of Dark Skin in mice. *Genes & Dev* 2003;17:214-228.

20 28. Nielsen UB, Cardone MH, Sinskey AJ, MacBeath G, Sorger PK. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:9330-5.

29. Burgess AW, Cho H, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;12:541-552.

25 30. Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem.* 2002;277:46265-46272.

31. Lorenzato A, Olivero M, Patrane S, et al. Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Res* 2002; 62:7025-30.

32. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer *Nature* 2002;417:906-7.

33. Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 2003;300:949.

5 34. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990;247:824-30.

10 35. Heinrich, MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003 ;21:4342-4349.

36. Li B, Chang C, Yuan M, McKenna WG<sub>3</sub> Shu HG. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res* 2003;63:7443-7450.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor irreversível de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para o tratamento de câncer resistente a gefitinib e/ou erlotinib.  
5
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor irreversível de EGFR é selecionado dentre o grupo consistindo de EKB-569, HKI-272 e HKI-357.
3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor irreversível de EGFR se liga a cisteína 797 de EGFR (SEQ ID NO: 1).  
10
4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de célula epitelial.
5. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer gastrointestinal, câncer da próstata, câncer ovariano, câncer da mama, câncer de cabeça e pescoço, câncer do esôfago, câncer de pulmão, câncer de pulmão de célula não pequena, câncer do sistema nervoso, câncer do rim, câncer da retina, câncer da pele, câncer do fígado, câncer pancreático, câncer genito-urinário ou câncer da bexiga.  
15
6. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor irreversível de EGFR é administrado simultaneamente com um inibidor reversível de EGFR.  
20
7. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o inibidor reversível de EGFR é gefitinib ou erlotinib.
8. Uso de uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de EGFR irreversível, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para o tratamento de câncer em um indivíduo com câncer tendo uma mutação no EGFR (SEQ ID NO: 1), em que a mutação é a substituição de uma metionina por uma treonina na posição 790.  
25

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR é selecionado dentre o grupo consistindo de EKB-569, HKI-272 e HKI-357.

5 10. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o inibidor irreversível de EGFR se liga à cisteína 797.

11. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de célula epitelial.

10 12. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer gastrointestinal, câncer da próstata, câncer ovariano, câncer da mama, câncer de cabeça e pescoço, câncer do esôfago, câncer de pulmão, câncer de pulmão de célula não pequena, câncer do sistema nervoso, câncer do rim, câncer da retina, câncer da pele, câncer do fígado, câncer pancreático, câncer genito-urinário ou câncer da bexiga.

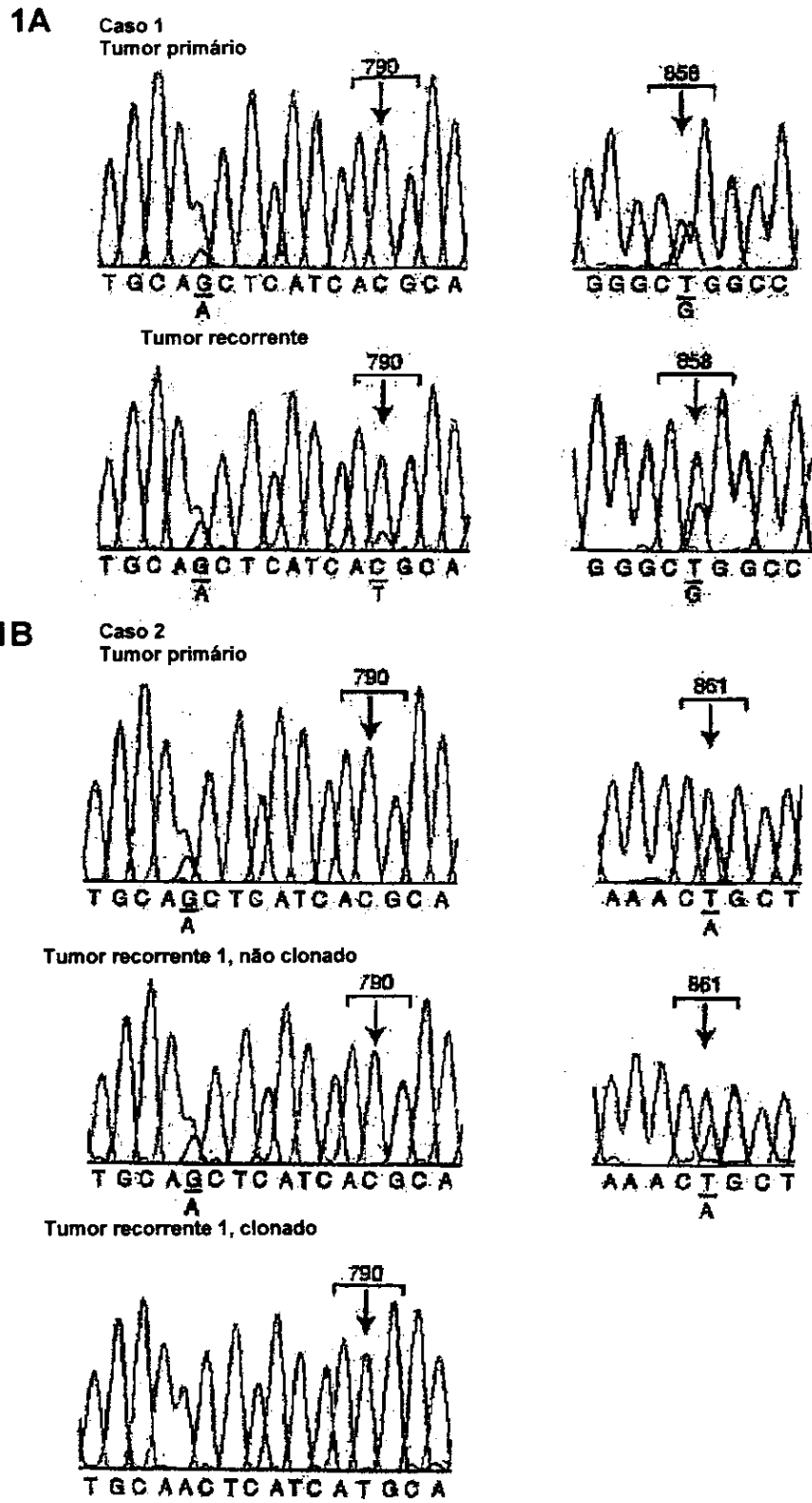
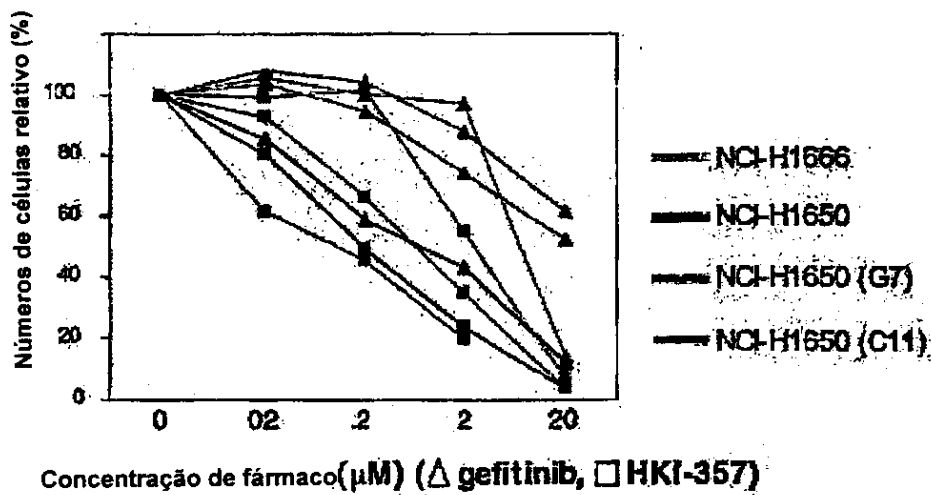
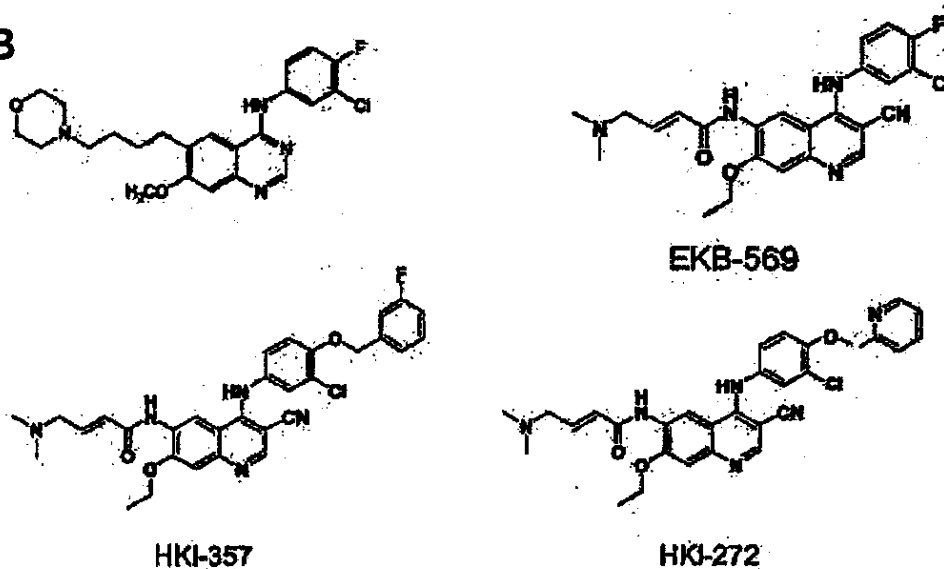


Fig. 1.

2A



2B



2C

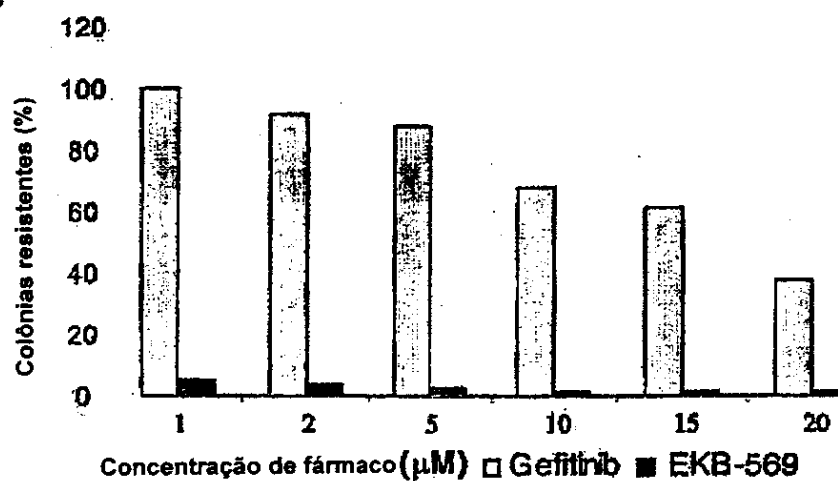


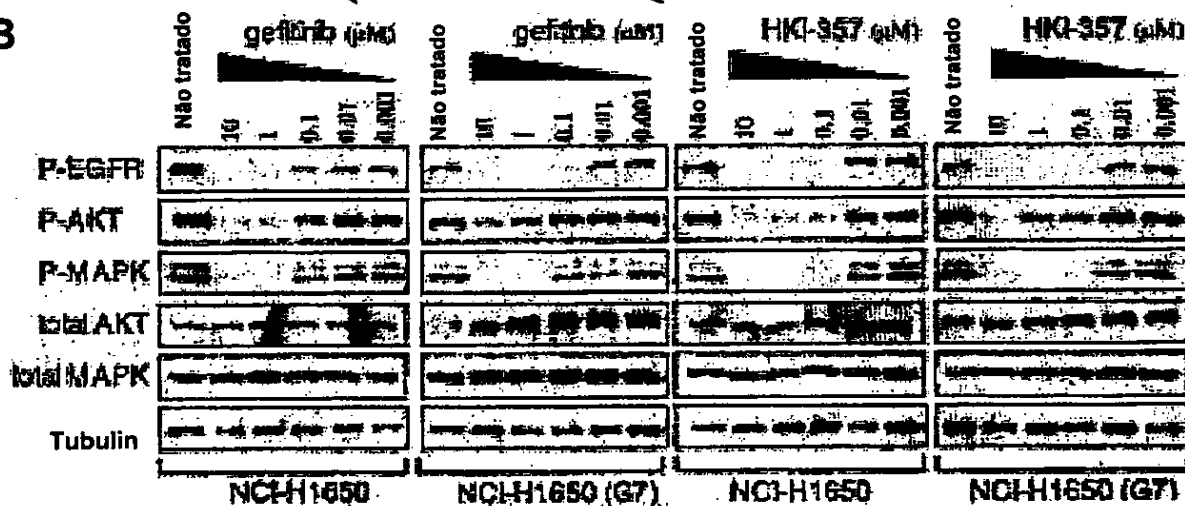
Fig. 2.

Fig. 3.

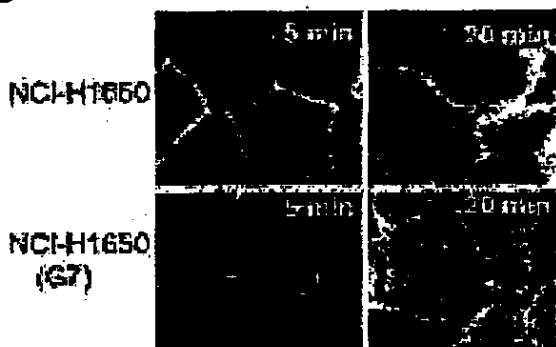
3A



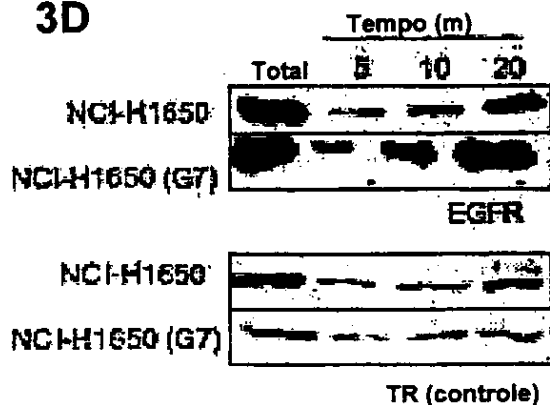
3B



3C



3D



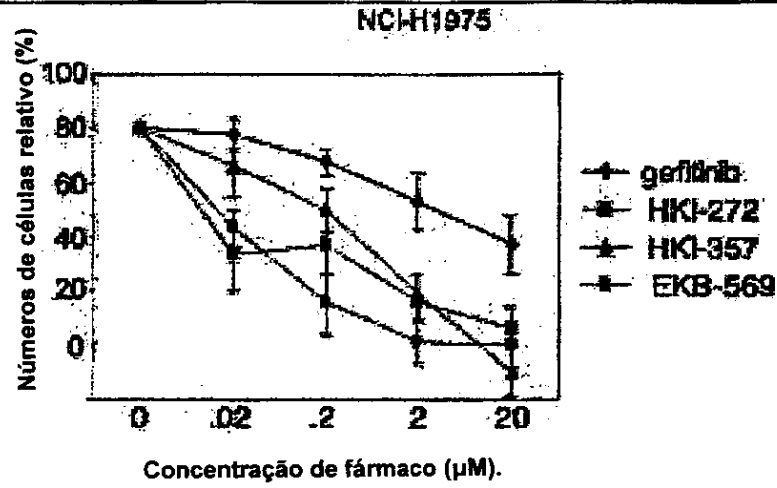
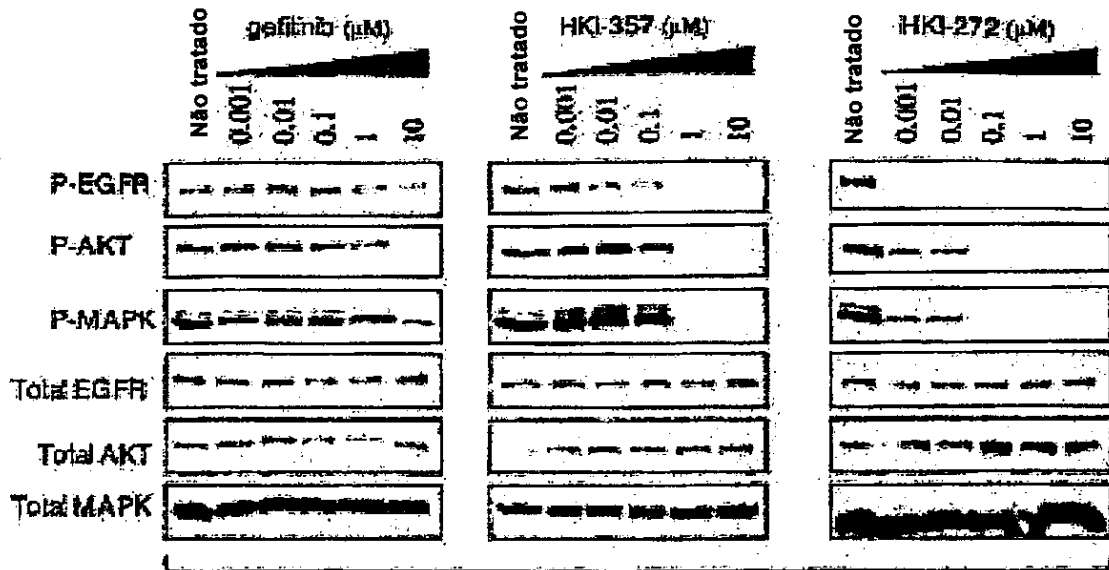


Fig. 4.

# Figura 5

CCGGGCGCAGCGCGGCCGAGCAGCCTCCGCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGACCGGG -185  
 .....  
 CCGAGGCGGCCGGAGTCCCAGCTAGCCCCGGCGGCGCGCCCGCCAGACCGGACGACA -125  
 .....  
 GGCCACCTCGTCGGCGTCCGCCCCGAGTCCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGCG -65  
 .....  
 CACGGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCTCTTCGGGGAG -5  
 .....  
 CAGCGATGCGACCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCT 55  
 .....M--R--P--S--G--T--A--G--A--A--L--L--A--L--L--A--A--L-- 18  
 GCGCGGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCA 115  
 C--P--A--S--R--A--L--E--E--K--K--V--C--Q--G--T--S--N--K--L-- 38  
 CGCAGTTGGGCACCTTTGAAGATCATTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTG 175  
 T--Q--L--G--T--F--E--D--H--F--L--S--L--Q--R--M--P--N--N--C-- 58  
 AGGTGGTCCTTGGGAATTTGGAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCT 235  
 E--V--V--L--G--N--L--E--I--T--Y--V--Q--R--N--Y--D--L--S--F-- 78  
 TAAAGACCATCCAGGAGGTGGCTGGTATGTCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAA 295  
 L--K--T--I--Q--E--V--A--G--Y--V--L--I--A--L--N--T--V--E--R-- 98  
 TTCCTTTGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCTATGCCT 355  
 I--P--L--E--N--L--Q--I--I--R--G--N--M--Y--Y--E--N--S--Y--A-- 118  
 TAGCAGTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAACCGGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAA 415  
 L--A--V--L--S--N--Y--D--A--N--K--T--G--L--K--E--L--P--M--R-- 138  
 ATTTACAGGAAATCCTGCATGGCGCGGTGCGGTTGAGCAACAACCTGCCCTGTGCAACG 475  
 N--L--Q--E--I--L--H--G--A--V--R--F--S--N--N--P--A--L--C--N-- 158  
 TGGAGAGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTGATGG 535  
 V--E--S--I--Q--W--R--D--I--V--S--S--D--F--L--S--N--M--S--M-- 178  
 ACTTCCAGAACCACCTGGGCGAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGCT 595  
 D--F--Q--N--H--L--G--S--C--Q--K--C--D--P--S--C--P--N--G--S-- 198  
 GCTGGGGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAATCATCTGTGCCCGAGCAGT 655  
 C--W--G--A--G--E--E--N--C--Q--K--L--T--K--I--I--C--A--Q--Q-- 218  
 GCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCAGTACTGCTGCCACAACAGTGTGCTGCAG 715  
 C--S--G--R--C--R--G--K--S--P--S--D--C--C--H--N--Q--C--A--A-- 238  
 GCTGCACAGGCCCGGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCGAGACGAAGCCA 775  
 G--C--T--G--P--R--E--S--D--C--L--V--C--R--K--F--R--D--E--A-- 258  
 CGTGC AAGGACACCTGCCCCCCACTCATGCTCTACAACCCACCACGTACCAGATGGATG 835  
 T--C--K--D--T--C--P--P--L--M--L--Y--N--P--T--T--Y--Q--M--D-- 278  
 TGAACCCCGAGGGCAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCGTAATT 895  
 V--N--P--E--G--K--Y--S--F--G--A--T--C--V--K--K--C--P--R--N-- 298

## Figura 5 Cont.

ATGTGGTGACAGATCACGGCTCGTGCGTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGG 955  
 Y--V--V--T--D--H--G--S--C--V--R--A--C--G--A--D--S--Y--E--M-- 318

AGGAAGACGGCGTCCGCAAGTGTAAAGAAGTGCAGAGGGCCTTGCCGCAAAGTGTGTAAACG 1015  
 E--E--D--G--V--R--K--C--K--K--C--E--G--P--C--R--K--V--C--N-- 338

GAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACT 1075  
 G--I--G--I--G--E--F--K--D--S--L--S--I--N--A--T--N--I--K--H-- 358

TCAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGCTGGCATTAGGGGTG 1135  
 F--K--N--C--T--S--I--S--G--D--L--H--I--L--P--V--A--F--R--G-- 378

ACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTAA 1195  
 D--S--F--T--H--T--P--P--L--D--P--Q--E--L--D--I--L--K--T--V-- 398

AGGAAATCACAGGGTTTTTGTCTGATTGAGGCTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATG 1255  
 K--E--I--T--G--F--L--L--I--Q--A--W--P--E--N--R--T--D--L--H-- 418

CCTTTGAGAACCTAGAAATCATAAGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTGTG 1315  
 A--F--E--N--L--E--I--I--R--G--R--T--K--Q--H--G--Q--F--S--L-- 438

CAGTCCTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATG 1375  
 A--V--V--S--L--N--I--T--S--L--G--L--R--S--L--K--E--I--S--D-- 458

GAGATGTGATAATTTGAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAAGTGGAAAA 1435  
 G--D--V--I--I--S--G--N--K--N--L--C--Y--A--N--T--I--N--W--K-- 478

AACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT 1495  
 K--L--F--G--T--S--G--Q--K--T--K--I--I--S--N--R--G--E--N--S-- 498

GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGG 1555  
 C--K--A--T--G--Q--V--C--H--A--L--C--S--P--E--G--C--W--G--P-- 518

AGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGT 1615  
 E--P--R--D--C--V--S--C--R--N--V--S--R--G--R--E--C--V--D--K-- 538

GCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAAGTCTGAGTGCATACAGTGCC 1675  
 C--N--L--L--E--G--E--P--R--E--F--V--E--N--S--E--C--I--Q--C-- 558

ACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAAGT 1735  
 H--P--E--C--L--P--Q--A--M--N--I--T--C--T--G--R--G--P--D--N-- 578

GSTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAG 1795  
 C--I--Q--C--A--H--Y--I--D--G--P--H--C--V--K--T--C--P--A--G-- 598

TCAATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACCGCAGACGCCCGCCATGTGTGCCACC 1855  
 V--M--G--E--N--N--T--L--V--W--K--Y--A--D--A--G--H--V--C--H-- 618

IGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGA 1915  
 L--C--H--P--N--C--T--Y--G--C--T--G--P--G--L--E--G--C--P--T-- 638

ATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTGTGCTGTGG 1975  
 V--G--P--K--I--P--S--I--A--T--G--M--V--G--A--L--L--L--L--L-- 658

TGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTTGGAAGCGCACGC 2035  
 V--V--A--L--G--I--G--L--F--M--R--R--R--H--I--V--R--K--R--T-- 678

# Figura 5 Cont.

TGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTTTACACCCAGTGGAGAAGCTC 2095  
L--R--R--L--L--Q--E--R--E--L--V--E--P--L--T--P--S--G--E--A-- 698

CCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAACTGAATTCAAAAGATCAAAGTGTGG 2155  
P--N--Q--A--L--L--R--I--L--K--E--T--E--F--K--K--I--K--V--L-- 718

GCTCCGGTGCCTTCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCAGAAGGTGAGAAAGTTA 2215  
G--S--G--A--F--G--T--V--Y--K--G--L--W--I--P--E--G--E--K--V-- 738

AAATTCCTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCACCAAGGAAA 2275  
K--I--P--V--A--I--K--E--L--R--E--A--T--S--P--K--A--N--K--E-- 758

TCCTCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCTGTGG 2335  
I--L--D--E--A--Y--V--M--A--S--V--D--N--P--H--V--C--R--L--L-- 778

GCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCAGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCC 2395  
G--I--C--L--T--S--T--V--Q--L--I--T--Q--L--M--P--F--G--C--L-- 798

TGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTG 2455  
L--D--Y--V--R--E--H--K--D--N--I--G--S--Q--Y--L--L--N--W--C-- 818

TGCAGATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACTGG 2515  
V--Q--I--A--K--G--M--N--Y--L--E--D--R--R--L--V--H--R--D--L-- 838

CAGCCAGGAACGTACTGGTGAACACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGG 2575  
A--A--R--N--V--L--V--K--T--P--Q--H--V--K--I--T--D--F--G--L-- 858

CCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATCA 2635  
A--K--L--L--G--A--E--E--K--E--Y--H--A--E--G--G--K--V--P--I-- 878

AGTGGATGGCAATGGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGTCTGGA 2695  
K--W--M--A--L--E--S--I--L--H--R--I--Y--T--H--Q--S--D--V--W-- 898

GCTACGGGGTGAAGTGTGGAGTGTGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGAATCC 2755  
S--Y--G--V--T--V--W--E--L--M--T--F--G--S--K--P--Y--D--G--I-- 918

CTGCCAGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAACGCCTCCCTCAGCCACCCATAT 2815  
P--A--S--E--I--S--S--I--L--E--K--G--E--R--L--P--Q--P--P--I-- 938

GTACCATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGTGGATGATAGACGCAGATAGTCGCC 2875  
C--T--I--D--V--Y--M--I--M--V--K--C--W--M--I--D--A--D--S--R-- 958

CRAAGTTCGGTGAAGTGTGATCATGAATTCFCAAATGGCCCGAGACCCCCAGCGCTACC 2935  
P--K--F--R--E--L--I--I--E--F--S--K--M--A--R--D--P--Q--R--Y-- 978

TTGTCAATCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCTCAGACTCCAACCTCTACC 2995  
L--V--I--Q--G--D--E--R--M--H--L--P--S--P--T--D--S--N--F--Y-- 998

GTGCCCTGATGGATGAAGAAGACATGGACGACGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATCC 3055  
R--A--L--M--D--E--E--D--M--D--D--V--V--D--A--D--E--Y--L--I-- 1018

CACAGCAGGGCTTCTTCAGCAGCCCCCTCCACGTCACGGACTCCCCTCCTGAGCTCTCTGA 3115  
P--Q--Q--G--F--F--S--S--P--S--T--S--R--T--P--L--L--S--S--L-- 1038

GTGCAACCAGCAACAATTCACCGTGGCTTGCATTGATAGAAATGGGCTGCAAGCTGTGC 3175  
S--A--T--S--N--N--S--T--V--A--C--I--D--R--N--G--L--Q--S--C-- 1058

## Figura 5 Cont.

CCATCAAGGAAGACAGCTTCTTGCAGCGATACAGCTCAGACCCACAGGCGCCTTGACTG 3235  
 P--I--K--E--D--S--F--L--Q--R--Y--S--S--D--P--T--G--A--L--T-- 1078

AGGACAGCATAGACGACACCTTCCTCCAGTGCCTGAATACATAAACCCAGTCCGTTCCCA 3295  
 E--D--S--I--D--D--T--F--L--P--V--P--E--Y--I--N--Q--S--V--P-- 1098

AAAGGCCCGCTGGCTCTGTGCAGAATCCTGTCTATCACAATCAGCCTCTGAACCCCGCGC 3355  
 K--R--P--A--G--S--V--Q--N--P--V--Y--H--N--Q--P--L--N--P--A-- 1118

CCAGCAGAGACCCCACTACCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTATC 3415  
 P--S--R--D--P--H--Y--Q--D--P--H--S--T--A--V--G--N--P--E--Y-- 1138

TCAACACTGTCCAGCCCACCTGTGTCAACAGCACATTCGACAGCCCTGCCCACTGGGCCC 3475  
 L--N--T--V--Q--P--T--C--V--N--S--T--F--D--S--P--A--H--W--A-- 1158

AGAAAGGCAGCCACCAAATTAGCCTGGACAACCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCCA 3535  
 Q--K--G--S--H--Q--I--S--L--D--N--P--D--Y--Q--Q--D--F--F--P-- 1178

AGGAAGCCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTAA 3595  
 K--E--A--K--P--N--G--I--F--K--G--S--T--A--R--N--A--E--Y--L-- 1198

GGGTCGCGCCACAAAGCAGTGAATTTATTGGAGCATGA 3633 (SEQ ID NO 2 )  
 R--V--A--P--Q--S--S--E--F--I--G--A--\*-- 1210 (SEQ ID NO 1 )

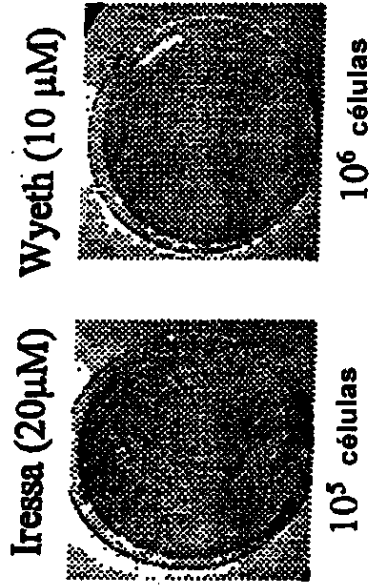


Fig. 9