

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

(21) **PI0606839-1 A2**



* B R P I O 6 0 6 8 3 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 02/02/2006
(43) Data da Publicação: 09/03/2010
(RPI 2044)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/00 (2010.01)

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

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

(73) Titular(es): THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION,
WYETH

(72) Inventor(es): Daniel Haber, Daphne Winifred Bell, Eunice L.
Kwak, Jeffrey E. Settleman, Nadia G. Godin-Heymann, Rafaella
Sordella, Sridhar Krishna Rabindran

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

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

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

(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.

“MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE CÂNCER”

ANTECEDENTES

Cânceres de células epiteliais, por exemplo, câncer da próstata, câncer da mama, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer pancreático, 5 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 tumor. Eventualmente, metástase em diferentes sítios de órgãos também podem ocorrer. Apesar de progressos terem sido obtidos no diagnóstico e 10 tratamento de vários cânceres, estas doenças ainda resultam em significativa mortalidade .

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 15 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 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 20 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 (NSCLC) é a causa líder de mortes por câncer nos Estados Unidos, Japão, e Europa Ocidental. Para pacientes com doença avançada, quimioterapia provê 25 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 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- α) 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- α 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.

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
15 impacto dramático na saúde dos indivíduos, e especialmente indivíduos mais velhos, dentre os quais o câncer é especialmente comum.

SUMÁRIO

Os inventores da presente invenção descobriram de modo surpreendente que inibidores de EGFR irreversíveis são efetivos no
20 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
25 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).

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 773 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.

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

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
15 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
20 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
25 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.

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 L858R-A750 em EGFR (NCI-H1 650) e dois derivados resistentes a gefitinib-(G7 e C1 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 biotilação 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

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 FIPIL1 - PDGFR- α 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, T790M, dentro do domínio de EGFR quinase foi registrada em três de seis

15 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 *FIPILI-PDGFR-a* (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., 11th 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),
20 deleção de resíduos 747 (lisina) a 750 (alanina), substituição de arginina por leucina em resíduo 858, substituição de glutamina por leucina em resíduo 861.

Cânceres podem ser diagnosticados como resistentes a gefitinib/ erlotinib após tratamento com gefitinib e/ou erlotinib ter começado.
25 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 diagnosticada menos de 6

meses após tratamento com gefitinib e/ou erlotinib ter começado. Diagnose de resistência a gefitinib e/ou erlotinib pode ser obtida 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 farmacêuticamente 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.

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.

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.

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 terapeuticamente 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 farmacologicamente aceitáveis para administração oral, retal, tópica ou parenteral (incluindo inalação, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular e
20 intravenosa) são conhecidos dos versados. O veículo deve ser farmacologicamente aceitável no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação e não deletérios para o seu recipiente.

Como usado aqui, os termos "farmacologicamente 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, glicocato 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.

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.

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.

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 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.

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.

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 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 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.

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). Seqüências 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
10 localmente dentro de um animal, ou circular na corrente sanguínea como células independentes.

EXEMPLOS

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. 11th NCI EORTC-AACR Symposium on New Drugs in Cancer
15 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
25 codon 790. Análise mutacional de *EGFR* (exons 1-28), *ERBB2* (exons 1-24), *PTEN* (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 flanqueamento 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
5 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 6×10^4 células por disco de 10-cm² em 20 µM gefitinib. Resistência relativa destas
10 células a gefitinib, comparado com os inibidores irreversíveis, foi obtida por semeadura de 5×10^4 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
15 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 (LRT1B), usando
20 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
25 inibidores irreversíveis foi determinada por semeadura de 9×10^4 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 signaling 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 biotinição 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 NH₄Cl/1 mM MgCl₂A).1 mM CaCl₂ 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 glutathiona (50 mM glutathiona/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 µM 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. NSCLC resistente a gefitinib recorrente desenvolvido 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 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 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.

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 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
10 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-HI 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 μ M para ERBB2) (Wyeth) (Fig. 2B). Todos os três fármacos são inibidores irreversíveis, mais provavelmente via uma ligação covalente com o resíduo cys773 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 μ 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 efector 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.

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.

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 estéreo-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.

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.

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

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

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 ZD1 839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001;61:8887-8895.

15 15. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N. The tyrosine kinase inhibitor ZD1 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. ZD1 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 ZD1 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 ZD1 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.

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

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.

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.

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.

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 WG₃, Shu HG. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res* 2003;63:7443-7450.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
WYETH

<120> Método para tratar câncer resistente Gefitinib

<130> 030258-57642-PCT

<140> PCT/US06/003717

<141> 2006-02-02

<150> 60/649,483

<151> 2005-02-03

<150> 60/671,989

<151> 2005-04-15

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 3878

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (246)..(3875)

<400> 1

```

cccggcgag cggggccgca gcagcctccg cccccgcac ggtgtgagcg cccgacggg 60
ccgaggcggc cggagtcccc agctagcccc ggcggccgcc gccgcccaga ccggacgaca 120
ggccacctcg tcggcgctcg cccgagtccc cgctcggccg ccaacgccac aaccaccgag 180
cacggcccc tgactcgcgc cagtattgat cgggagagcc ggagcgagct ctccggggag 240
cagcg atg cga ccc tcc ggg acg gcc ggg gca gcg ctc ctg gcg ctg ctg 290
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu
      1           5           10           15

gct gcg ctc tgc ccg gcg agt cgg gct ctg gag gaa aag aaa gtt tgc 338
Ala Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys
           20           25           30

caa ggc acg agt aac aag ctc acg cag ttg ggc act ttt gaa gat cat 386
Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His
           35           40           45

ttt ctc agc ctc cag agg atg ttc aat aac tgt gag gtg gtc ctt ggg 434
Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly
           50           55           60

```

aat ttg gaa att acc tat gtg cag agg aat tat gat ctt tcc ttc tta	482
Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu	
65 70 75	
aag acc atc cag gag gtg gct ggt tat gtc ctc att gcc ctc aac aca	530
Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr	
80 85 90 95	
gtg gag cga att cct ttg gaa aac ctg cag atc atc aga gga aat atg	578
Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met	
100 105 110	
tac tac gaa aat tcc tat gcc tta gca gtc tta tct aac tat gat gca	626
Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala	
115 120 125	
aat aaa acc gga ctg aag gag ctg ccc atg aga aat tta cag gaa atc	674
Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile	
130 135 140	
ctg cat ggc gcc gtg cgg ttc agc aac aac cct gcc ctg tgc aac gtg	722
Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val	
145 150 155	
gag agc atc cag tgg cgg gac ata gtc agc agt gac ttt ctc agc aac	770
Glu Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn	
160 165 170 175	
atg tcg atg gac ttc cag aac cac ctg ggc agc tgc caa aag tgt gat	818
Met Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp	
180 185 190	
cca agc tgt ccc aat ggg agc tgc tgg ggt gca gga gag gag aac tgc	866
Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys	
195 200 205	
cag aaa ctg acc aaa atc atc tgt gcc cag cag tgc tcc ggg cgc tgc	914
Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys	
210 215 220	
cgt ggc aag tcc ccc agt gac tgc tgc cac aac cag tgt gct gca ggc	962
Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly	
225 230 235	
tgc aca ggc ccc cgg gag agc gac tgc ctg gtc tgc cgc aaa ttc cga	1010
Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg	
240 245 250 255	
gac gaa gcc acg tgc aag gac acc tgc ccc cca ctc atg ctc tac aac	1058
Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn	
260 265 270	
ccc acc acg tac cag atg gat gtg aac ccc gag ggc aaa tac agc ttt	1106
Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe	
275 280 285	

ggt gcc acc tgc gtg aag aag tgt ccc cgt aat tat gtg gtg aca gat	1154
Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp	
290 295 300	
cac ggc tgc tgc gtc cga gcc tgt ggg gcc gac agc tat gag atg gag	1202
His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu	
305 310 315	
gaa gac ggc gtc cgc aag tgt aag aag tgc gaa ggg cct tgc cgc aaa	1250
Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys	
320 325 330 335	
gtg tgt aac gga ata ggt att ggt gaa ttt aaa gac tca ctc tcc ata	1298
Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile	
340 345 350	
aat gct acg aat att aaa cac ttc aaa aac tgc acc tcc atc agt ggc	1346
Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly	
355 360 365	
gat ctc cac atc ctg ccg gtg gca ttt agg ggt gac tcc ttc aca cat	1394
Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His	
370 375 380	
act cct cct ctg gat cca cag gaa ctg gat att ctg aaa acc gta aag	1442
Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys	
385 390 395	
gaa atc aca ggg ttt ttg ctg att cag gct tgg cct gaa aac agg acg	1490
Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr	
400 405 410 415	
gac ctc cat gcc ttt gag aac cta gaa atc ata cgc ggc agg acc aag	1538
Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys	
420 425 430	
caa cat ggt cag ttt tct ctt gca gtc gtc agc ctg aac ata aca tcc	1586
Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser	
435 440 445	
ttg gga tta cgc tcc ctc aag gag ata agt gat gga gat gtg ata att	1634
Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile	
450 455 460	
tca gga aac aaa aat ttg tgc tat gca aat aca ata aac tgg aaa aaa	1682
Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys	
465 470 475	
ctg ttt ggg acc tcc ggt cag aaa acc aaa att ata agc aac aga ggt	1730
Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly	
480 485 490 495	
gaa aac agc tgc aag gcc aca ggc cag gtc tgc cat gcc ttg tgc tcc	1778
Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser	
500 505 510	

ccc gag ggc tgc tgg ggc ccg gag ccc agg gac tgc gtc tct tgc cgg 1826
Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg
515 520 525

aat gtc agc cga ggc agg gaa tgc gtg gac aag tgc aac ctt ctg gag 1874
Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu
530 535 540

ggt gag cca agg gag ttt gtg gag aac tct gag tgc ata cag tgc cac 1922
Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His
545 550 555

cca gag tgc ctg cct cag gcc atg aac atc acc tgc aca gga cgg gga 1970
Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly
560 565 570 575

cca gac aac tgt atc cag tgt gcc cac tac att gac ggc ccc cac tgc 2018
Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys
580 585 590

gtc aag acc tgc ccg gca gga gtc atg gga gaa aac aac acc ctg gtc 2066
Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val
595 600 605

tgg aag tac gca gac gcc ggc cat gtg tgc cac ctg tgc cat cca aac 2114
Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn
610 615 620

tgc acc tac gga tgc act ggg cca ggt ctt gaa ggc tgt cca acg aat 2162
Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn
625 630 635

ggg cct aag atc ccg tcc atc gcc act ggg atg gtg ggg gcc ctc ctc 2210
Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu
640 645 650 655

ttg ctg ctg gtg gtg gcc ctg ggg atc ggc ctc ttc atg cga agg cgc 2258
Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg
660 665 670

cac atc gtt cgg aag cgc acg ctg cgg agg ctg ctg cag gag agg gag 2306
His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu
675 680 685

ctt gtg gag cct ctt aca ccc agt gga gaa gct ccc aac caa gct ctc 2354
Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu
690 695 700

ttg agg atc ttg aag gaa act gaa ttc aaa aag atc aaa gtg ctg ggc 2402
Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly
705 710 715

tcc ggt gcg ttc ggc acg gtg tat aag gga ctc tgg atc cca gaa ggt 2450
Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly
720 725 730 735

gag aaa gtt aaa att ccc gtc gct atc aag gaa tta aga gaa gca aca Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr	2498
740 745 750	
tct ccg aaa gcc aac aag gaa atc ctc gat gaa gcc tac gtg atg gcc Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala	2546
755 760 765	
agc gtg gac aac ccc cac gtg tgc cgc ctg ctg ggc atc tgc ctc acc Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr	2594
770 775 780	
tcc acc gtg cag ctc atc acg cag ctc atg ccc ttc ggc tgc ctc ctg Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu	2642
785 790 795	
gac tat gtc cgg gaa cac aaa gac aat att ggc tcc cag tac ctg ctc Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu	2690
800 805 810 815	
aac tgg tgt gtg cag atc gca aag ggc atg aac tac ttg gag gac cgt Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg	2738
820 825 830	
cgc ttg gtg cac cgc gac ctg gca gcc agg aac gta ctg gtg aaa aca Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr	2786
835 840 845	
ccg cag cat gtc aag atc aca gat ttt ggg ctg gcc aaa ctg ctg ggt Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly	2834
850 855 860	
gcg gaa gag aaa gaa tac cat gca gaa gga ggc aaa gtg cct atc aag Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys	2882
865 870 875	
tgg atg gca ttg gaa tca att tta cac aga atc tat acc cac cag agt Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser	2930
880 885 890 895	
gat gtc tgg agc tac ggg gtg acc gtt tgg gag ttg atg acc ttt gga Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly	2978
900 905 910	
tcc aag cca tat gac gga atc cct gcc agc gag atc tcc tcc atc ctg Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu	3026
915 920 925	
gag aaa gga gaa cgc ctc cct cag cca ccc ata tgt acc atc gat gtc Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val	3074
930 935 940	
tac atg atc atg gtc aag tgc tgg atg ata gac gca gat agt cgc cca Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro	3122
945 950 955	

aag ttc cgt gag ttg atc atc gaa ttc tcc aaa atg gcc cga gac ccc 3170
Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro
960 965 970 975

cag cgc tac ctt gtc att cag ggg gat gaa aga atg cat ttg cca agt 3218
Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser
980 985 990

cct aca gac tcc aac ttc tac cgt gcc ctg atg gat gaa gaa gac atg 3266
Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met
995 1000 1005

gac gac gtg gtg gat gcc gac gag tac ctc atc cca cag cag ggc ttc 3314
Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
1010 1015 1020

ttc agc agc ccc tcc acg tca cgg act ccc ctc ctg agc tct ctg agt 3362
Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser
1025 1030 1035

gca acc agc aac aat tcc acc gtg gct tgc att gat aga aat ggg ctg 3410
Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu
1040 1045 1050 1055

caa agc tgt ccc atc aag gaa gac agc ttc ttg cag cga tac agc tca 3458
Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser
1060 1065 1070

gac ccc aca ggc gcc ttg act gag gac agc ata gac gac acc ttc ctc 3506
Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu
1075 1080 1085

cca gtg cct gaa tac ata aac cag tcc gtt ccc aaa agg ccc gct ggc 3554
Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly
1090 1095 1100

tct gtg cag aat cct gtc tat cac aat cag cct ctg aac ccc gcg ccc 3602
Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro
1105 1110 1115

agc aga gac cca cac tac cag gac ccc cac agc act gca gtg ggc aac 3650
Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn
1120 1125 1130 1135

ccc gag tat ctc aac act gtc cag ccc acc tgt gtc aac agc aca ttc 3698
Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe
1140 1145 1150

gac agc cct gcc cac tgg gcc cag aaa ggc agc cac caa att agc ctg 3746
Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu
1155 1160 1165

gac aac cct gac tac cag cag gac ttc ttt ccc aag gaa gcc aag cca 3794
Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro
1170 1175 1180

aat ggc atc ttt aag ggc tcc aca gct gaa aat gca gaa tac cta agg 3842
 Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg
 1185 1190 1195

gtc gcg cca caa agc agt gaa ttt att gga gca tga 3878
 Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
 1200 1205 1210

<210> 2

<211> 1210

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
 210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255
 Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335
 Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350
 Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365
 Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
 370 375 380
 Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
 385 390 395 400
 Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
 405 410 415
 Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
 660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
 675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
 690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
 805 810 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
 820 825 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
 835 840 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
 850 855 860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
 865 870 875 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
 995 1000 1005

Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe
 1010 1015 1020

Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala
 1025 1030 1035 1040

Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln
 1045 1050 1055

Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp
 1060 1065 1070

Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro
 1075 1080 1085

Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser
 1090 1095 1100

Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser
 1105 1110 1115 1120

Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro
 1125 1130 1135

Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp
 1140 1145 1150

Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp
 1155 1160 1165

Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn
 1170 1175 1180

Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val
 1185 1190 1195 1200

Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
 1205 1210

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> seqüência artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 3

tgc arctcat c acgca

16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> seqüência artificial

<220>

<223> Descrição de seqüência artificial de nucleotídeos
 sintético

<400> 4

tgc arctcat caygca

16

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> seqüência artificial

<220>

<223> Descrição de seqüência artificial de nucleotídeos
 sintético

<400> 5

tgcaactcat catgca

16

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratamento de câncer resistente a gefitinib e/ou erlotinib, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

5 a. monitorar progressão de um câncer em um indivíduo em um ponto no tempo após o indivíduo ter iniciado tratamento com gefitinib e/ou erlotinib, em que progressão do câncer é indicativa de câncer que é resistente a tratamento com gefitinib e/ou erlotinib; e

10 b. administrar ao indivíduo tendo um câncer que é resistente a tratamento com gefitinib e/ou erlotinib uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de receptor de fator de crescimento epidérmico irreversível (EGFR).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR irreversível é selecionado dentre o grupo consistindo de EKB-569, HKI-272 e HKI-357.

15 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR irreversível liga a cisteína 773 de EGFR (SEQ ID NO: 1).

20 4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que progressão do câncer é monitorada por meio de inspeção visual do câncer.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que inspeção visual do câncer é por meio de raio-X, varredura por CT ou MRI.

25 6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a progressão do câncer é monitorada por meio de detecção de biomarcador de tumor.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que monitorar a progressão de um câncer compreende comparar o câncer em um segundo ponto no tempo com o câncer em um primeiro ponto

no tempo, em que o segundo ponto no tempo é após o primeiro ponto no tempo, em que o primeiro ponto no tempo é antes ou após iniciação de tratamento com gefitinib e/ou erlotinib, em que um crescimento aumentado do câncer indica progressão do câncer.

5 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que nos pontos no tempo adicionais o câncer é comparado com pontos no tempo precedentes.

 9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de célula epitelial.

10 10. Método 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,
15 câncer pancreático, câncer genito-urinário e câncer da bexiga.

 11. Método para tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

 a. administrar gefitinib e/ou erlotinib a um indivíduo com câncer;

20 b. monitorar progressão do câncer do indivíduo; e

 c. administrar ao indivíduo um inibidor de EGFR irreversível quando de indicação de progressão do câncer.

 12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR irreversível é selecionado dentre o grupo
25 consistindo de EKB-569, HKI-272 e HKI-357.

 13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR irreversível liga a cisteína 773 de EGFR (SEQ ID NO: 1).

 14. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado

pelo fato de que a progressão do câncer é monitorada por meio de inspeção visual do câncer.

5 15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que inspeção visual do câncer é por meio de raio-X, varredura por CT ou MRI.

16. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a progressão do câncer é monitorada por meio de detecção de biomarcador de tumor.

10 17. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que monitorar a progressão de um câncer compreende comparar o câncer em um segundo ponto no tempo com o câncer em um primeiro ponto no tempo, em que o segundo ponto no tempo é após o primeiro ponto no tempo, em que o primeiro ponto no tempo é antes ou após iniciação de tratamento com gefitinib e/ou erlotinib, em que o crescimento aumentado do
15 câncer indica progressão do câncer.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que nos pontos no tempo adicionais o câncer é comparado com pontos no tempo precedentes.

20 19. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de célula epitelial.

25 20. Método de acordo com a reivindicação 11, 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 e câncer da bexiga.

21. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR irreversível é administrado simultaneamente com um inibidor de EGFR reversível.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR reversível é gefitinib ou erlotinib.

23. Método para tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo com um câncer tendo uma
5 mutação em EGFR (SEQ ID NO: 1), que a mutação é substituição de uma metionina por uma treonina na posição 790, uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de EGFR irreversível.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR é selecionado dentre o grupo consistindo
10 de EKB-569, HKI-272 e HKI-357.

25. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o inibidor de EGFR irreversível liga a cisteína 773

26. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de célula epitelial.

27. Método de acordo com a reivindicação 23, 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,
15 câncer pancreático, câncer genito-urinário e câncer da bexiga.
20

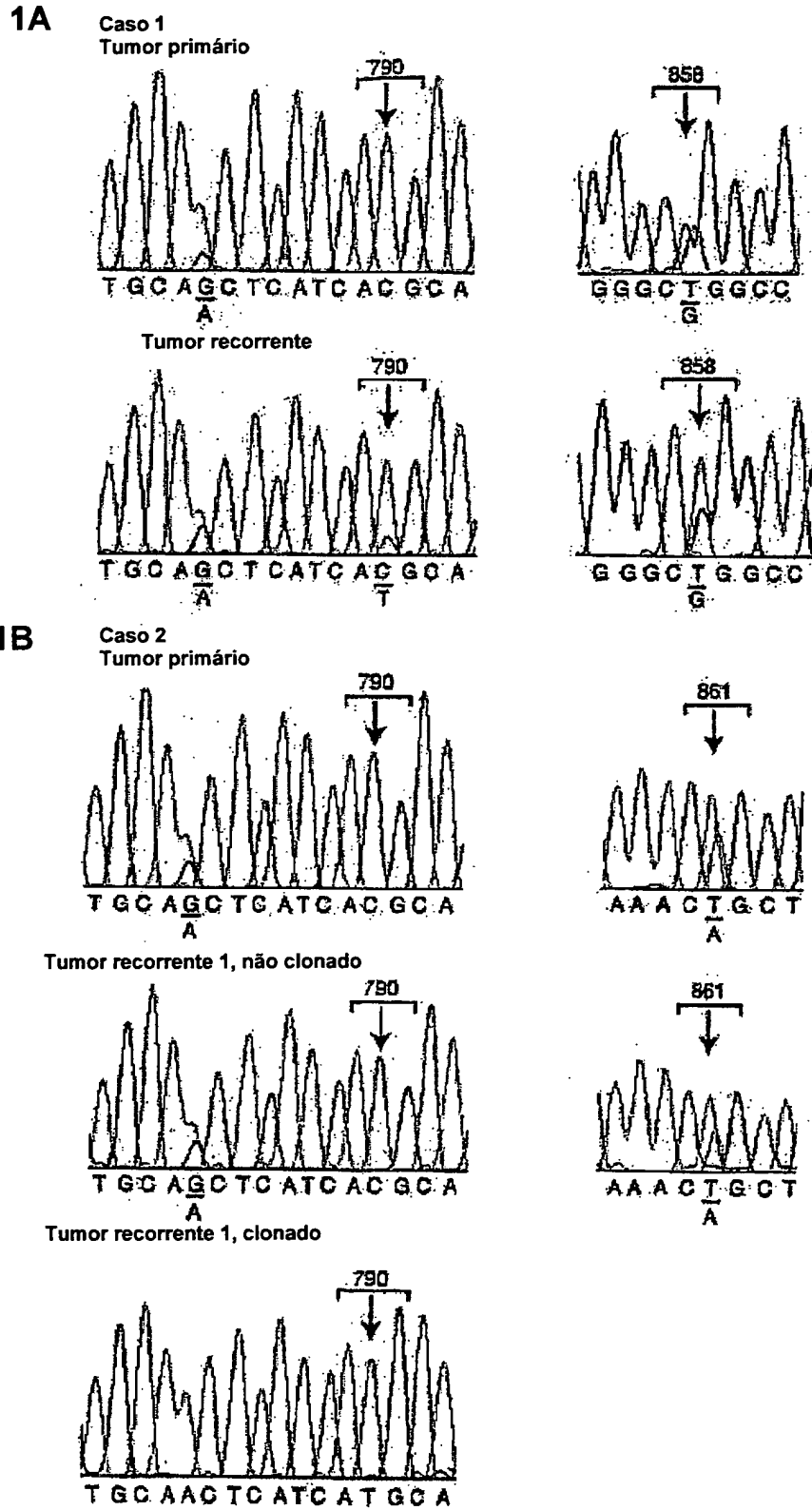
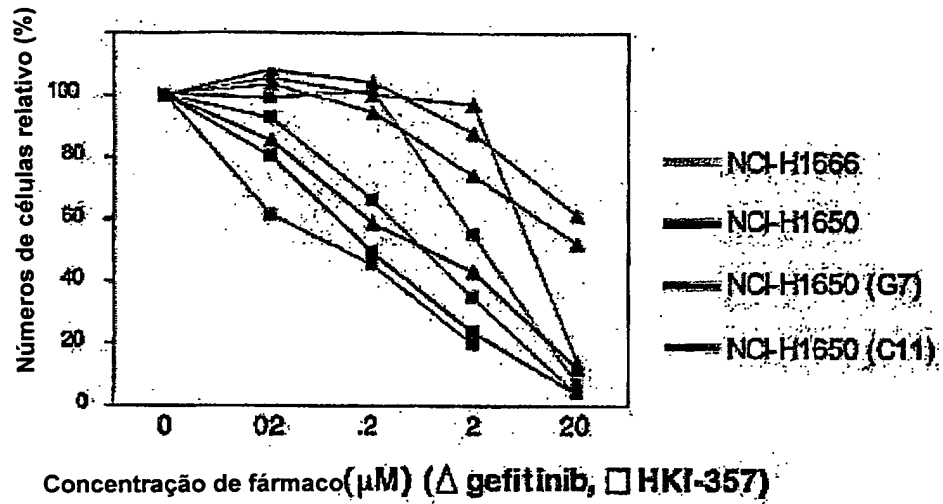
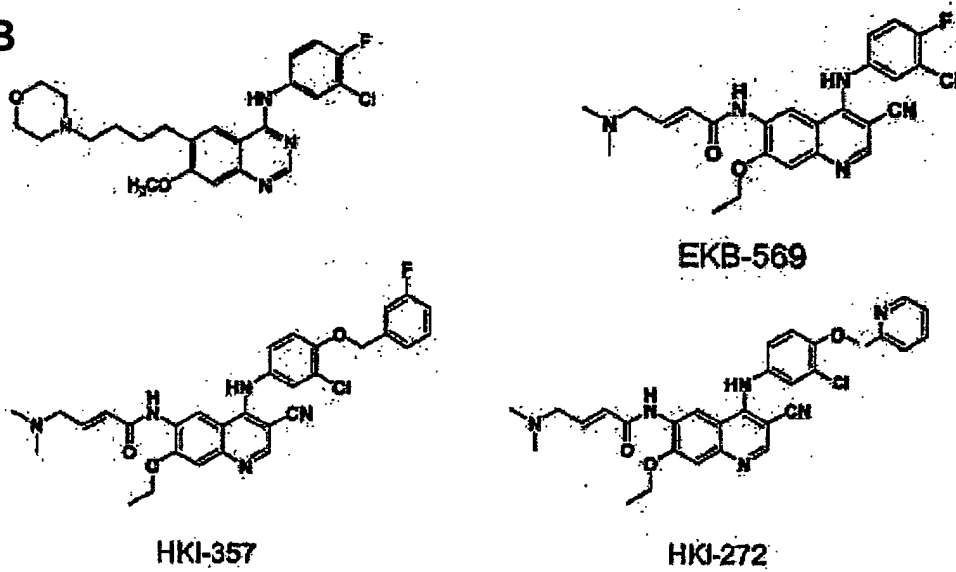


Fig. 1.

2A



2B



2C

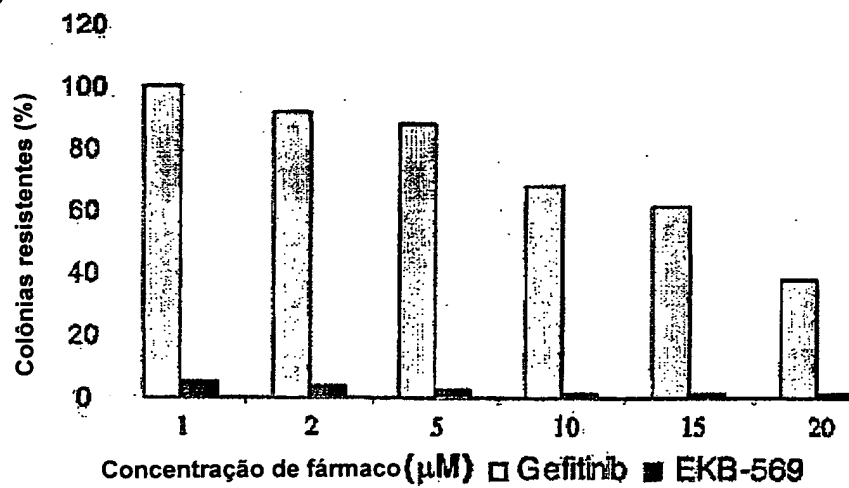


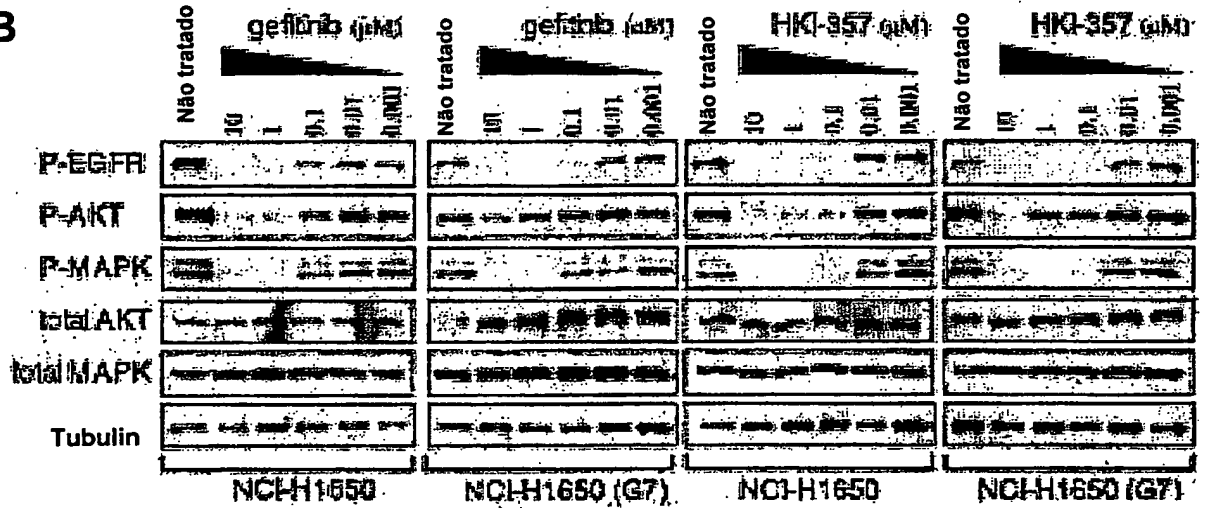
Fig. 2.

Fig. 3.

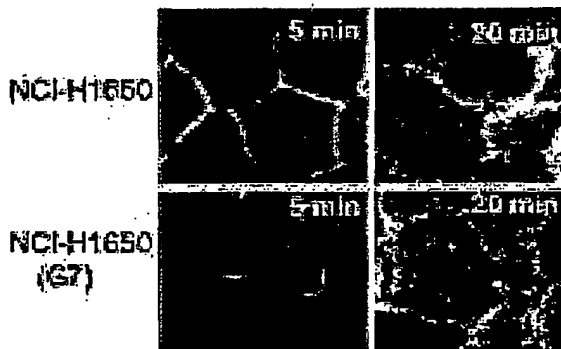
3A



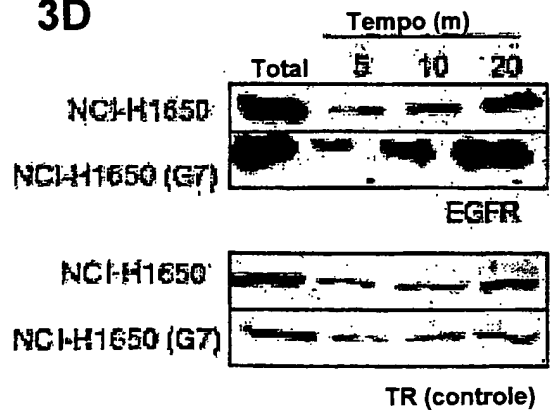
3B



3C



3D



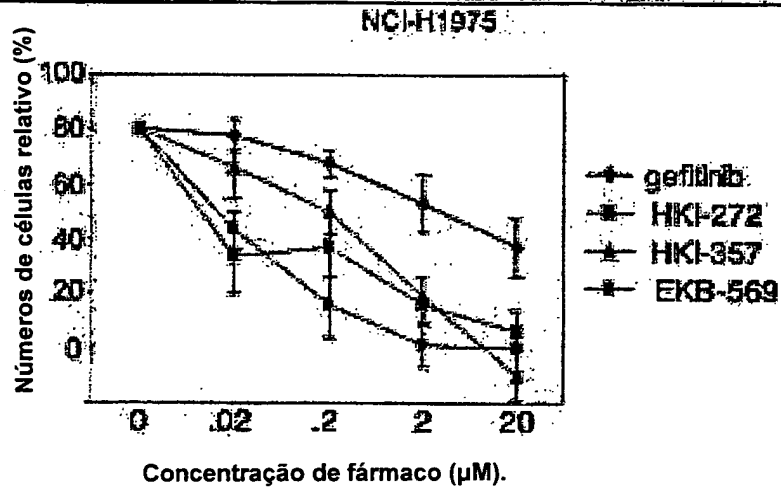
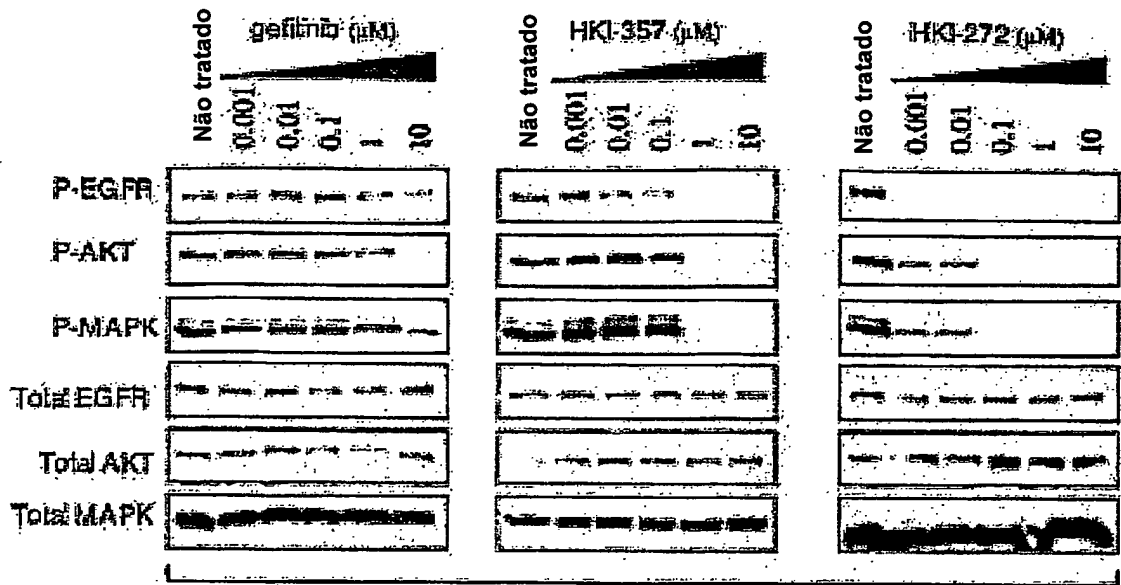


Fig. 4.

Figura 5

CCCGGCGCAGCGCGGCCGAGCAGCCTCCGCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGACCGG -185

 CCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAGCTAGCCCCGGCGGGCCGCGCCCGCCAGACCGGACGACA -125

 GGCCACCTCGTCGGCGTCCGCCCCGAGTCCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGG -65

 CACGGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCTCTTCGGGGAG -5

 CAGCGATCGGACCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCT 55
-M--R--P--S--G--T--A--G--A--A--L--L--A--L--L--A--A--L-- 18
 GCCCGCGAGTCCGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCA 115
 C--P--A--S--R--A--L--E--E--K--K--V--C--Q--G--T--S--N--K--L-- 38
 CGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCATTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTG 175
 T--Q--L--G--T--F--E--D--H--F--L--S--L--Q--R--M--F--N--N--C-- 58
 AGGTGGTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCT 235
 E--V--V--L--G--N--L--E--I--T--Y--V--Q--R--N--Y--D--L--S--F-- 78
 TAAAGACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAA 295
 L--K--T--I--Q--E--V--A--G--Y--V--L--I--A--L--N--T--V--E--R-- 98
 TTCCTTTGGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTAAGAAATTCCTATGCCT 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
 ATTTACAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTGAGCAACAACCCTGCCCTGTGCAACG 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
 GCTGGGGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAAATCATCTGTGCCACAGCAGT 655
 C--W--G--A--G--E--E--N--C--Q--K--L--T--K--I--I--C--A--Q--Q-- 218
 GCTCCGGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCAGTGCCTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCAG 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
 CGTGCAAGGACACCTGCCCCCCACTCATGCTCTACAACCCACCACGTACCAGATGGATG 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

GAGATGTGATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAA 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

GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGG 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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 5 Cont.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GCTACGGGGTACTGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGAATCC 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

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

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

TTGTCAATCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCCTACAGACTCCAACCTCTACC 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

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

GTGCAACCAGCAACAATCCACCGTGGCTTGCAATGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGTC 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.

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

AGGACAGCATAGACGACACCTTCCTCCCAGTGCCTGAATACATAAACCCAGTCCGTTCCCA 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

AGGAAGCCAAGCCAAATGCCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTAA 3595
 K--E--A--K--P--N--G--I--F--K--G--S--T--A--E--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)

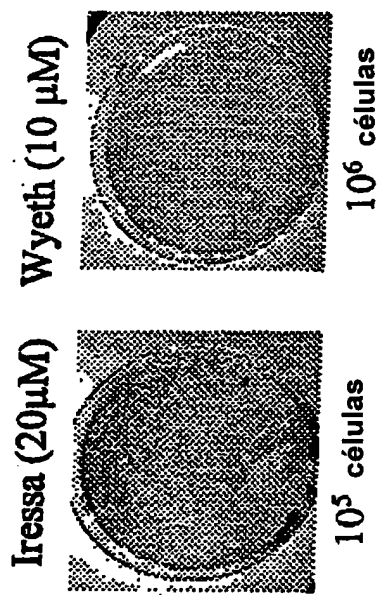


Fig. 9

RESUMO

“MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE CÂNCER”

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 de receptor de fator de crescimento epidérmico irreversível (EGFR). Em formas de realização preferidas, o inibidor de EGFR irreversível é EKB-569, HKI-272 e HKI-357.

A requerente apresenta novas vias das páginas 7 e 8 do relatório descritivo, novas folhas 1/12 a 12/12 dos desenhos e a listagem de sequência para melhor esclarecer o invento do presente pedido.

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.

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

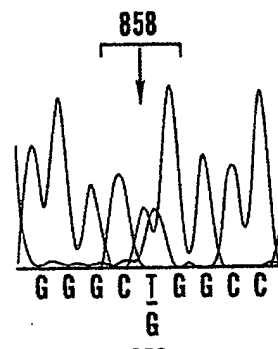
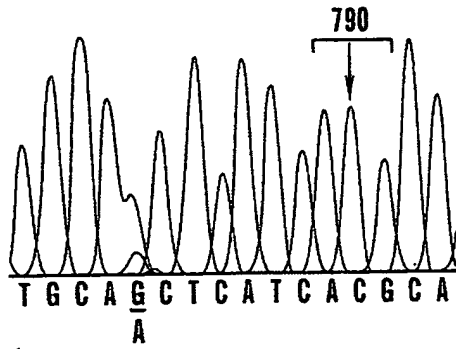
Figuras 1A-1B mostram análise EGFR de seqüência em lesões metastáticas recorrente de dois pacientes NSCLC com resistência adquirida a gefitinib. Figura IA mostra análise de seqüência para caso 1. A mutação de T790M em EGFR está presente em uma lesão no fígado recorrente após o desenvolvimento de resistência clínica a gefitinib. (Esquerda) A mutação não foi detectada no lesão primária do pulmão no momento da diagnose. (Direita) Tanto a tumor primária 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 primárias 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 (SEQ ID NOS 3 & 4 descritas respectivamente em ordem de aparecimento). 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 (SEQ ID NOS 3 & 5 descritas respectivamente em ordem de aparecimento).

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.

Figuras 3A-3D mostram dependência persistente em

Caso 1
Tumor primário



Tumor recorrente

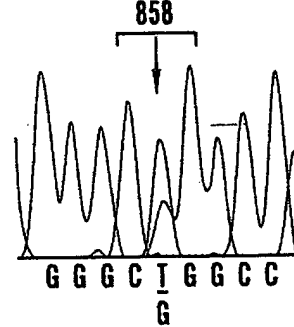
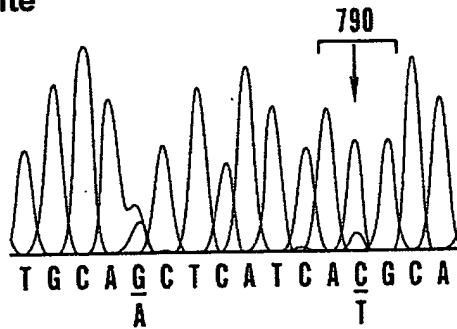
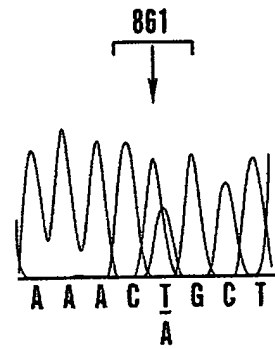
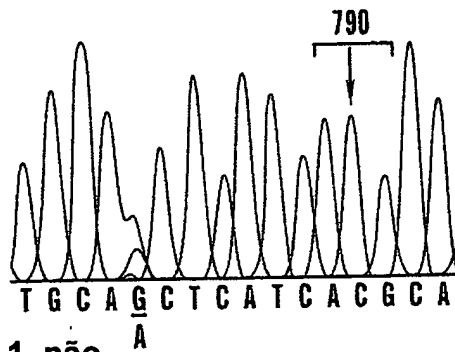
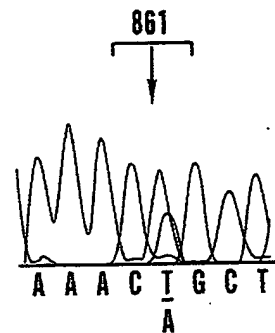
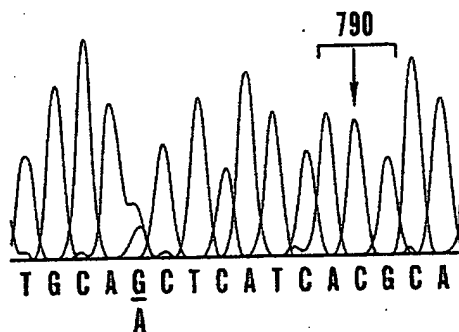


FIG. 1A

Caso 2
Tumor primário



Tumor recorrente 1, não clonado



Tumor recorrente 1, clonado

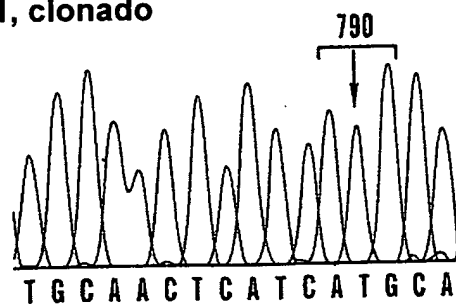
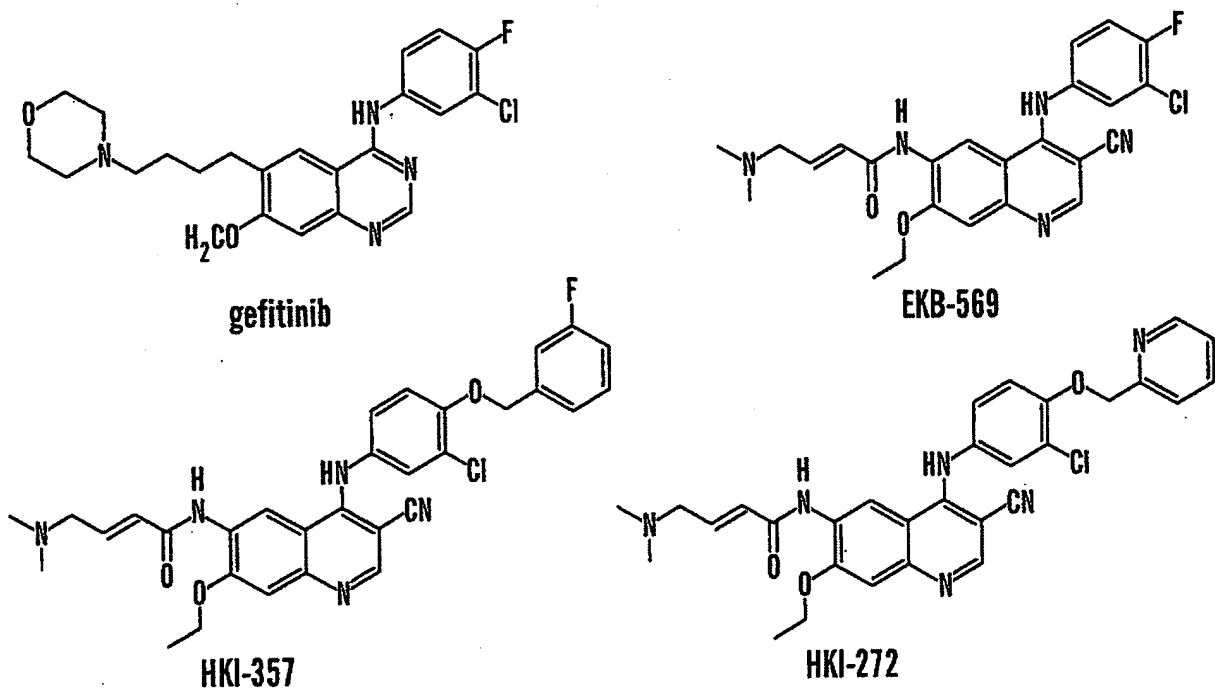
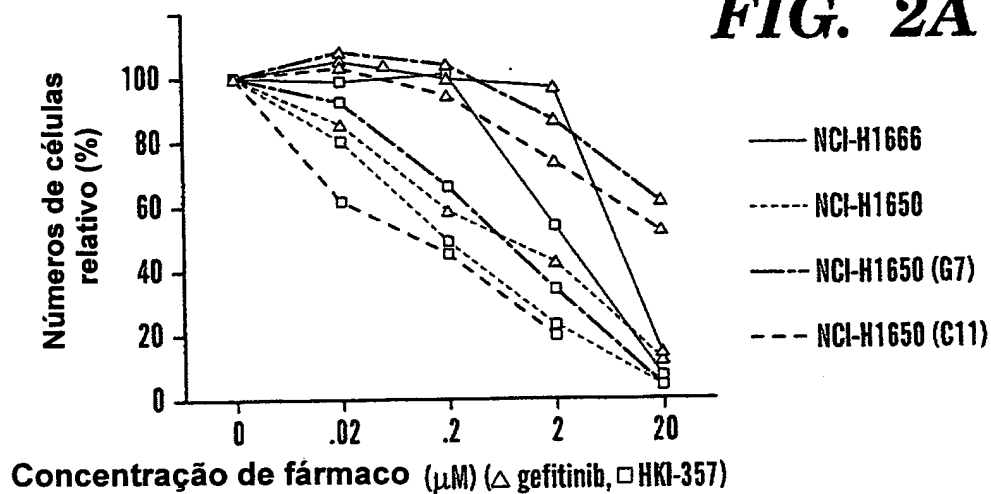
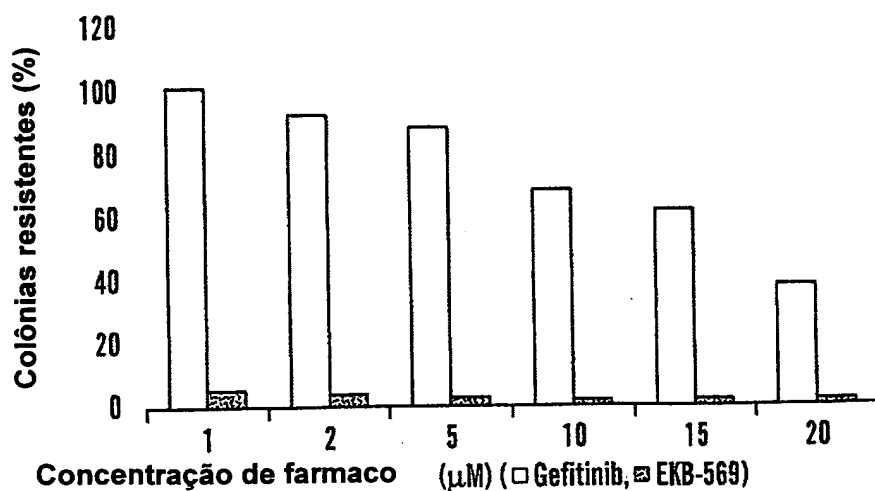
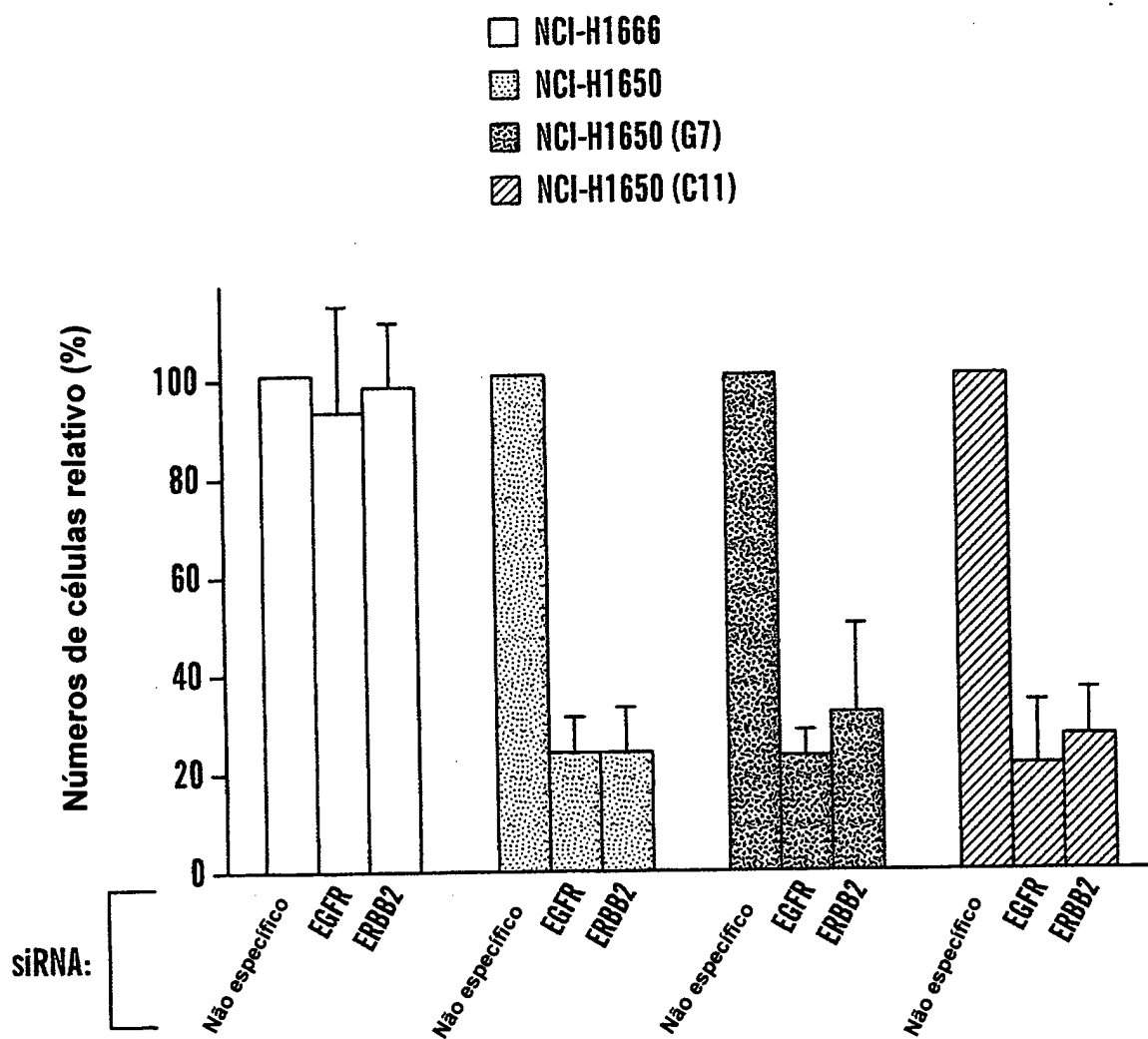


FIG. 1B

FIG. 2A**FIG. 2B****FIG. 2C**

**FIG. 3A**

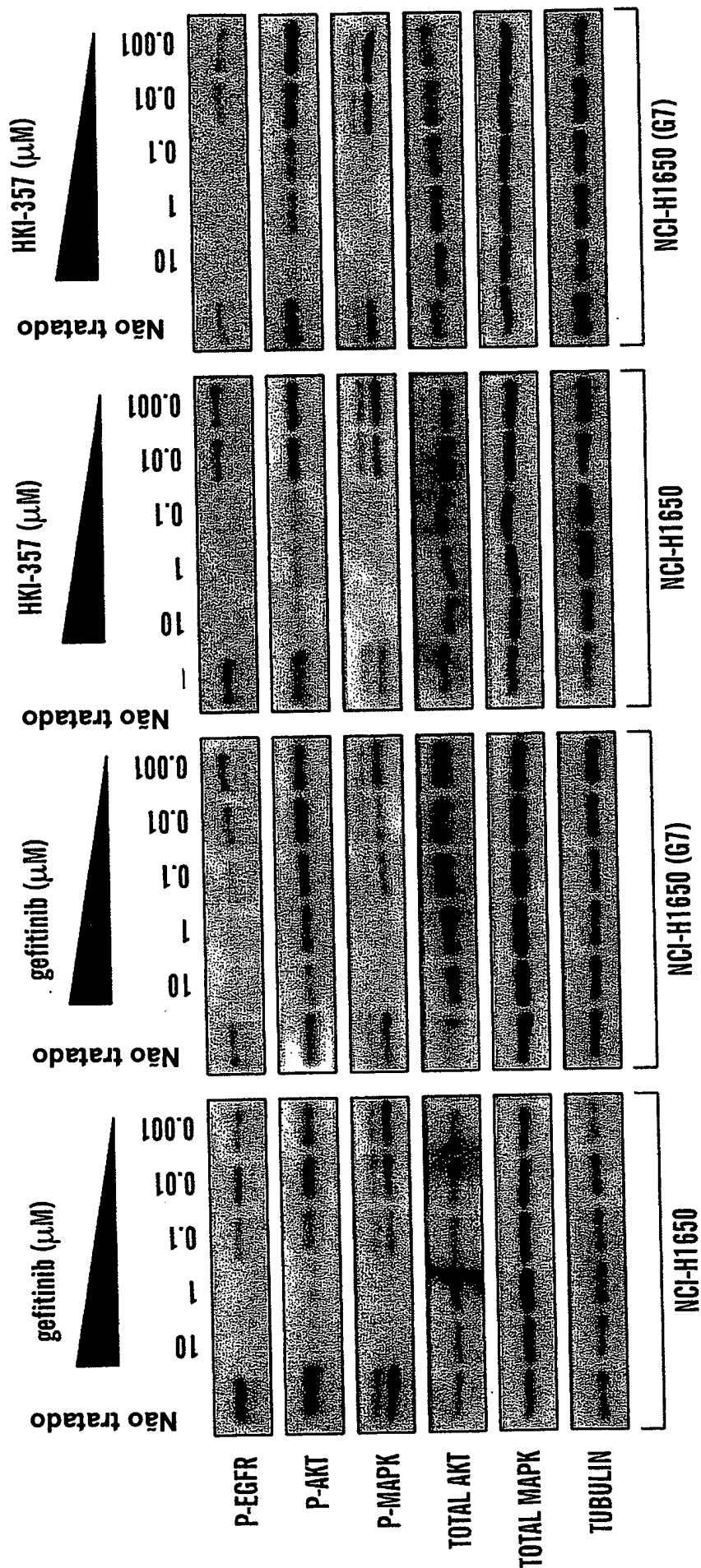


FIG. 3B

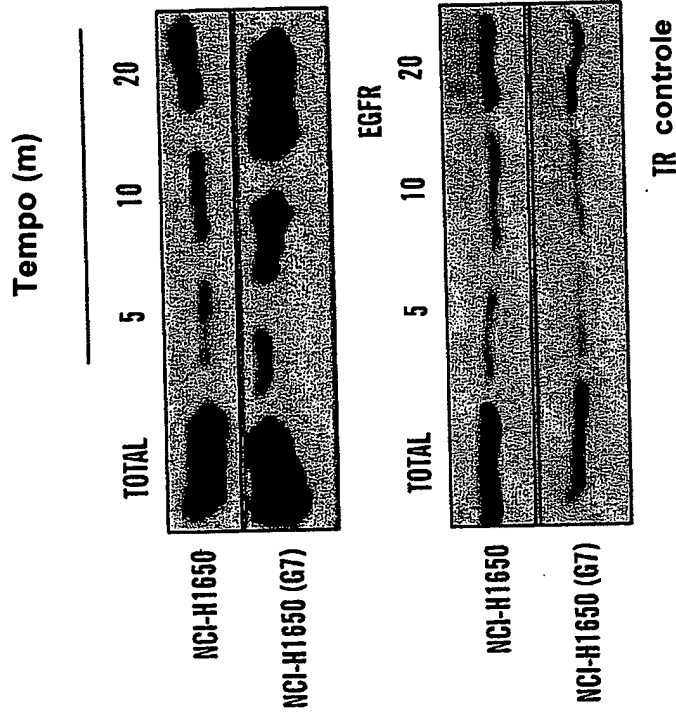


FIG. 3D

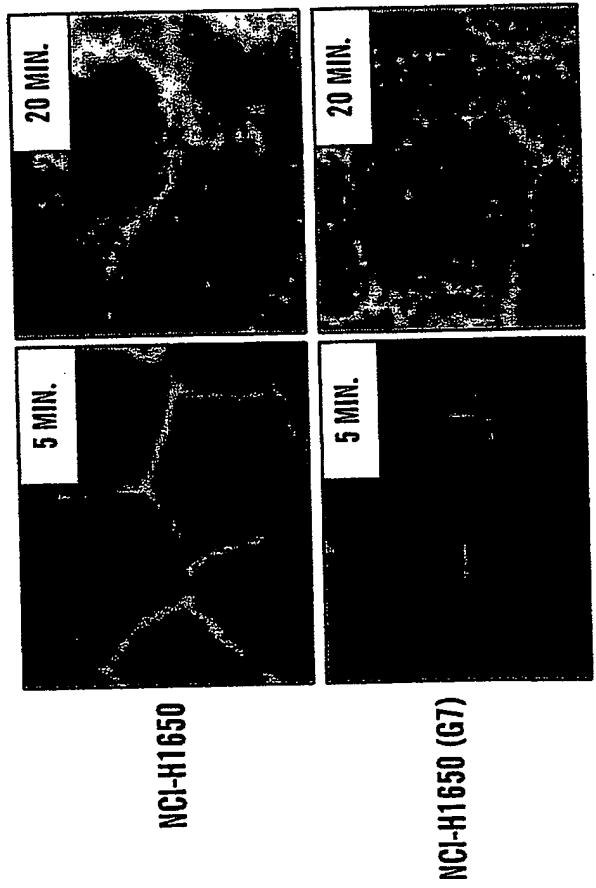
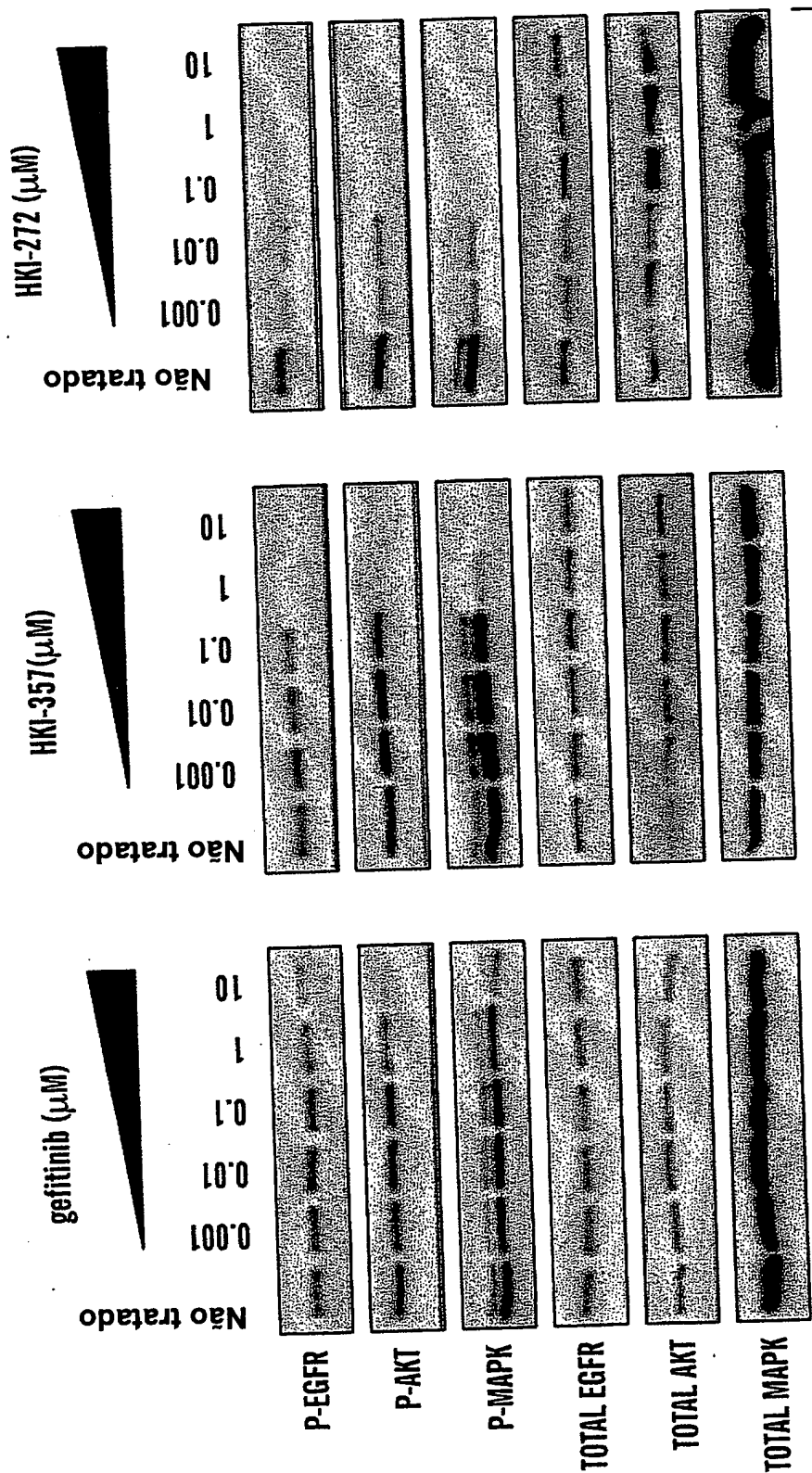
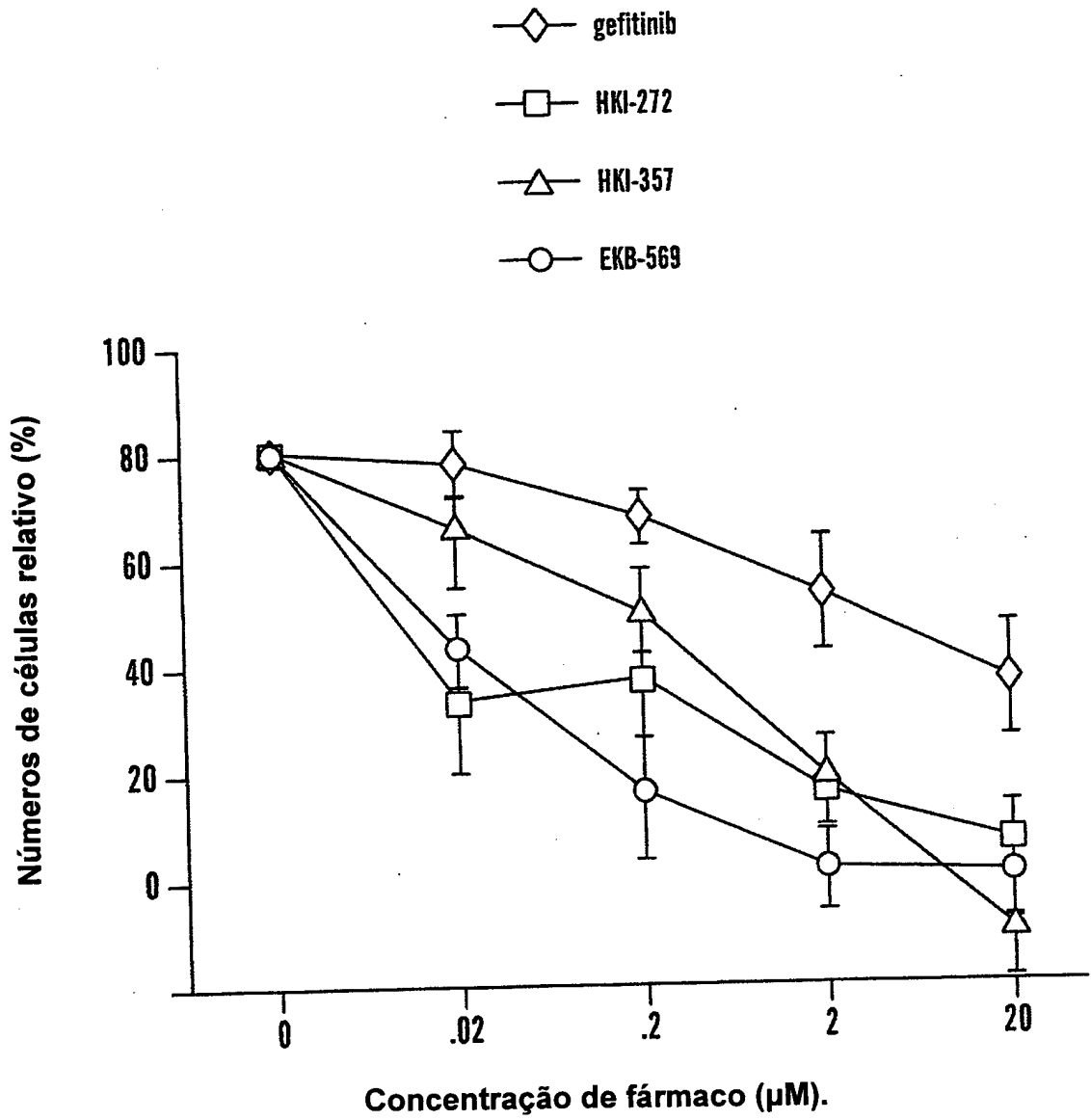


FIG. 3C



NCI-H1975

FIG. 4A

**FIG. 4B**

CCCGGCGCAGCGCGGCCGCAGCAGCCTCCGCCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCCGACGCGG -185

 CCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAGCTAGCCCCGGCGGCCGCCGCCAGACCGGACGACA -125

 GGCCACCTCGTCCGGCGTCCGCCCGAGTCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGCG -65

 CACGGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCTCTTCGGGGAG -5

 CAGCGATGCGACCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCT 55
-M--R--P--S--G--T--A--G--A--A--L--L--A--L--L--A--A--L-- 18
 GCCCCGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCA 115
 C--P--A--S--R--A--L--E--E--K--K--V--C--Q--G--T--S--N--K--L-- 38
 CGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCATTTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTG 175
 T--Q--L--G--T--F--E--D--H--F--L--S--L--Q--R--M--F--N--N--C-- 58
 AGGTGGTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCT 235
 E--V--V--L--G--N--L--E--I--T--Y--V--Q--R--N--Y--D--L--S--F-- 78
 TAAAGACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAA 295
 L--K--T--I--Q--E--V--A--G--Y--V--L--I--A--L--N--T--V--E--R-- 98
 TTCCTTTGGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCTATGCCT 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
 ATTTACAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTTCAGCAACAACCCTGCCCTGTGCAACG 475
 N--L--Q--E--I--L--H--G--A--V--R--F--S--N--N--P--A--L--C--N-- 158
 TGGAGAGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTTCGATGG 535
 V--E--S--I--Q--W--R--D--I--V--S--S--D--F--L--S--N--M--S--M-- 178
 ACTTCCAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGCT 595
 D--F--Q--N--H--L--G--S--C--Q--K--C--D--P--S--C--P--N--G--S-- 198
 GCTGGGGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAATCATCTGTGCCAGCAGT 655
 C--W--G--A--G--E--E--N--C--Q--K--L--T--K--I--I--C--A--Q--Q-- 218
 GCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCAG 715
 C--S--G--R--C--R--G--K--S--P--S--D--C--C--H--N--Q--C--A--A-- 238
 GCTGCACAGGCCCCCCGGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCGAGACGAAGCCA 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
 TGAACCCCGAGGGCAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCCGTAATT 895
 V--N--P--E--G--K--Y--S--F--G--A--T--C--V--K--K--C--P--R--N-- 298

FIG. 5

ATGTGGTGACAGATCACGGCTCGTGCGTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGG 955
 Y--V--V--T--D--H--G--S--C--V--R--A--C--G--A--D--S--Y--E--M-- 318
 AGGAAGACGGCGTCCGCAAGTGTAAGAAGTGC GAAGGGCCTTGCCGCAAAGTGTGTAACG 1015
 E--E--D--G--V--R--K--C--K--K--C--E--G--P--C--R--K--V--C--N-- 338
 GAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACT 1075
 G--I--G--I--G--E--F--K--D--S--L--S--I--N--A--T--N--I--K--H-- 358
 TCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTG 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
 AGGAAATCACAGGGTTTTTGTGATTTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATG 1255
 K--E--I--T--G--F--L--L--I--Q--A--W--P--E--N--R--T--D--L--H-- 418
 CCTTTGAGAACCTAGAAATCATAACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTG 1315
 A--F--E--N--L--E--I--I--R--G--R--T--K--Q--H--G--Q--F--S--L-- 438
 CAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATG 1375
 A--V--V--S--L--N--I--T--S--L--G--L--R--S--L--K--E--I--S--D-- 458
 GAGATGTGATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAA 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
 GCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGA ACTCTGAGTGCATACAGTGCC 1675
 C--N--L--L--E--G--E--P--R--E--F--V--E--N--S--E--C--I--Q--C-- 558
 ACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACA ACT 1735
 H--P--E--C--L--P--Q--A--M--N--I--T--C--T--G--R--G--P--D--N-- 578
 GTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAG 1795
 C--I--Q--C--A--H--Y--I--D--G--P--H--C--V--K--T--C--P--A--G-- 598
 TCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACC 1855
 V--M--G--E--N--N--T--L--V--W--K--Y--A--D--A--G--H--V--C--H-- 618
 TGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGA 1915
 L--C--H--P--N--C--T--Y--G--C--T--G--P--G--L--E--G--C--P--T-- 638
 ATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGG 1975
 N--G--P--K--I--P--S--I--A--T--G--M--V--G--A--L--L--L--L--L-- 658
 TGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTTTCGGAAGCGCACGC 2035
 V--V--A--L--G--I--G--L--F--M--R--R--R--H--I--V--R--K--R--T-- 678

FIG. 5 (CONT.)

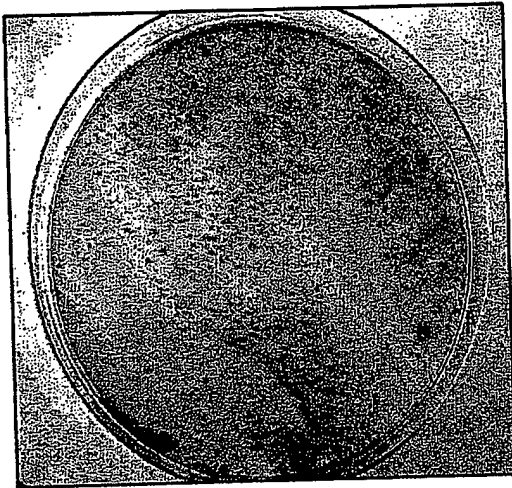
TCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTC 2095
 L--R--R--L--L--Q--E--R--E--L--V--E--P--L--T--P--S--G--E--A-- 698
 CCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTGCTGG 2155
 P--N--Q--A--L--L--R--I--L--K--E--T--E--F--K--K--I--K--V--L-- 718
 GCTCCGGTGCGTTCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTA 2215
 G--S--G--A--F--G--T--V--Y--K--G--L--W--I--P--E--G--E--K--V-- 738
 AAATTC~~CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAA~~ 2275
 K--I--P--V--A--I--K--E--L--R--E--A--T--S--P--K--A--N--K--E-- 758
 TCCTCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCTGG 2335
 I--L--D--E--A--Y--V--M--A--S--V--D--N--P--H--V--C--R--L--L-- 778
 GCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCC 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
 TGCAGATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTGG 2515
 V--Q--I--A--K--G--M--N--Y--L--E--D--R--R--L--V--H--R--D--L-- 838
 CAGCCAGGAACGTACTGGTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGG 2575
 A--A--R--N--V--L--V--K--T--P--Q--H--V--K--I--T--D--F--G--L-- 858
 CCAAAGTGC~~TGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATCA~~ 2635
 A--K--L--L--G--A--E--E--K--E--Y--H--A--E--G--G--K--V--P--I-- 878
 AGTGGATGGCATTGGAATCAATTTTACACAGAATCTATAACCCACCAGAGTGATGTCTGGA 2695
 K--W--M--A--L--E--S--I--L--H--R--I--Y--T--H--Q--S--D--V--W-- 898
 GCTACGGGGTGACTGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGAATCC 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
 GTACCATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGCTGGATGATAGACGCAGATAGTCGCC 2875
 C--T--I--D--V--Y--M--I--M--V--K--C--W--M--I--D--A--D--S--R-- 958
 CAAAGTTCCGTGAGTTGATCATCGAATTCTCCAAAATGGCCCGAGACCCCCAGCGCTACC 2935
 P--K--F--R--E--L--I--I--E--F--S--K--M--A--R--D--P--Q--R--Y-- 978
 TTGTCATTCAGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCCTACAGACTCCA~~ACTTCTACC~~ 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
 GTGCAACCAGCAACAATTCACCGTGGCTTGCAATTGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGTC 3175
 S--A--T--S--N--N--S--T--V--A--C--I--D--R--N--G--L--Q--S--C-- 1058

FIG. 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
 AGGACAGCATAGACGACACCTTCTCCAGTGCCTGAATACATAAACCAGTCCGTTCCTCA 3295
 E--D--S--I--D--D--T--F--L--P--V--P--E--Y--I--N--Q--S--V--P-- 1098
 AAAGGCCCGCTGGCTCTGTGCAGAATCCTGTCTATCACAAATCAGCCTCTGAACCCCGCGC 3355
 K--R--P--A--G--S--V--Q--N--P--V--Y--H--N--Q--P--L--N--P--A-- 1118
 CCAGCAGAGACCCACACTACCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTATC 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--E--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)

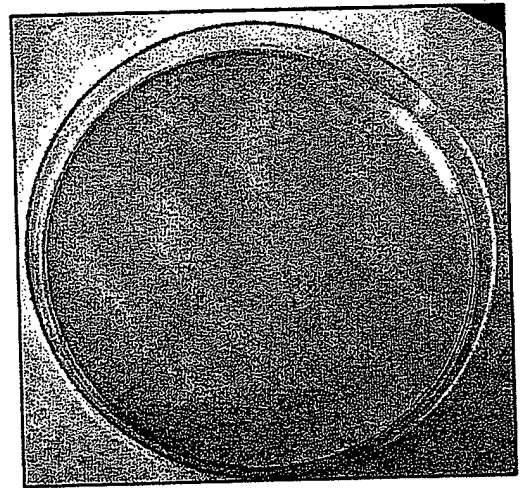
FIG. 5 (CONT.)

IRESSA (20 μ M)



10⁵ células

WYETH (10 μ M)



10⁶ células

FIG. 6

RESUMO

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

5 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
10 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 .

Câncer de pulmão permanece a causa líder por morte de

15 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

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.
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 773 de EGFR (SEQ ID NO: 1).
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.
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.
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.

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 773.

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.