



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 495**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4706 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06720163 .2**
96 Fecha de presentación : **02.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1848414**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2007**

54 Título: **Método para tratar cáncer resistente a gefitinib.**

30 Prioridad: **03.02.2005 US 649483 P**
15.04.2005 US 671989 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.09.2011

73 Titular/es: **The General Hospital Corporation**
55 Fruit Street
Boston, Massachusetts 02114, US
WYETH L.L.C.

72 Inventor/es: **Haber, Daniel;**
Bell, Daphne Winifred;
Settleman, Jeffrey E.;
Sordella, Raffaella;
Godin-Heymann, Nadia G.;
Kwak, Eunice L. y
Rabindran, Sridhar Krishna

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 364 495 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para tratar cáncer resistente a gefitinib

5 ANTECEDENTES

Los cánceres de células epiteliales, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de ovarios, cáncer del bazo, cáncer testicular, cáncer del timo, etc., son enfermedades caracterizadas por crecimiento acelerado, anómalo de células epiteliales. Este crecimiento acelerado provoca inicialmente que se forme un tumor. Finalmente, puede producirse también metástasis a diferentes sitios de órganos. Aunque se han realizado avances en el diagnóstico y tratamiento de diversos cánceres, estas enfermedades todavía dan como resultado una mortalidad significativa.

El cáncer de pulmón sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en países industrializados. Los cánceres que comienzan en los pulmones se dividen en dos tipos principales, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, dependiendo de cómo aparecen las células bajo un microscopio. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y carcinoma de células grandes) se extiende generalmente a otros órganos más lentamente de lo que lo hace el cáncer de pulmón de células pequeñas. Aproximadamente el 75 por ciento de casos de cáncer de pulmón se clasifican como cáncer de pulmón de células no pequeñas (por ejemplo, adenocarcinomas), y el otro 25 por ciento son cáncer de pulmón de células pequeñas. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es la principal causa de muertes por cáncer en los Estados Unidos, Japón y Europa occidental. Para los pacientes con enfermedad avanzada, la quimioterapia proporciona un beneficio modesto en la supervivencia, pero al coste de toxicidad significativa, lo que subraya la necesidad de agentes terapéuticos que se dirijan específicamente a las lesiones genéticas críticas que impulsan el crecimiento tumoral (Schiller JH *et al.*, N Engl J Med, 346: 92-98, 2002).

El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína unida a membrana de 170 kilodalton (kDa) expresada en la superficie de células epiteliales. EGFR es un miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento de proteína tirosina cinasas, una clase de moléculas reguladoras del ciclo celular. (W. J. Gullick *et al.*, 1986, Cancer Res., 46:285-292). EGFR se activa cuando su ligando (o bien EGF o bien TGF- α) se une al dominio extracelular, dando como resultado la autofosforilación del dominio tirosina cinasa intracelular del 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 es el producto proteico de un oncogén promotor del crecimiento, erbB o ErbB1, que es sólo un miembro de una familia, es decir, la familia ERBB de protooncogenes, que se cree que desempeña papeles fundamentales en el desarrollo y la evolución de muchos cánceres humanos. En particular, se ha observado aumento de la expresión de EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago así como glioblastomas. La familia ERBB de oncogenes codifica para cuatro receptores transmembrana relacionados estructuralmente, concretamente, EGFR, HER-2/neu (erbB2), HER-3 (erbB3) y HER-4 (erbB4). Clínicamente, se ha notificado que la amplificación del oncogén ERBB y/o sobreexpresión del receptor en tumores se correlaciona con la recidiva de la enfermedad y un mal pronóstico del paciente, así como con receptividad a la terapia. (L. Harris *et al.*, 1999, Int. J. Biol. Markers, 14: 8-15; y J. Mendelsohn y J. Baselga, 2000, Oncogene, 19:6550-6565).

EGFR está compuesto por tres dominios principales, concretamente, el dominio extracelular (ECD), que está glicosilado y contiene el bolsillo de unión a ligando con dos regiones ricas en cisteína; un dominio transmembrana corto y un dominio intracelular que tiene actividad tirosina cinasa intrínseca. La región transmembrana une el dominio de unión a ligando con el dominio intracelular. El análisis de la secuencia de aminoácidos y ADN, así como los estudios de formas no glicosiladas de EGFR, indican que la estructura principal proteica de EGFR tiene una masa de 132 kDa, con 1186 residuos de aminoácido (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; y F. L. V. Mayes y M. D. Waterfield, 1984, The EMBO J., 3:531-537).

La unión de EGF o TGF- α a EGFR activa una ruta de transducción de señales y da como resultado proliferación celular. La dimerización, los cambios conformacionales y la internalización de las moléculas de EGFR funcionan transmitiendo señales intracelulares que conducen a la regulación del crecimiento celular (G. Carpenter y S. Cohen, 1979, Ann. Rev. Biochem., 48:193-216). Las alteraciones genéticas que afectan a la regulación de la función de receptores de factores de crecimiento, o que conducen a la sobreexpresión del receptor y/o ligando, dan como resultado proliferación celular. Además, se ha determinado que EGFR desempeña un papel en la diferenciación celular, potenciación de la movilidad celular, secreción de proteínas, neovascularización, invasión, metástasis y resistencia de células cancerosas a agentes quimioterápicos y radiación. (M.-J. Oh *et al.*, 2000, Clin. Cancer Res., 6:4760-4763).

Se ha identificado una variedad de inhibidores de EGFR, incluyendo varios ensayos clínicos ya en curso para el tratamiento de diversos cánceres. Para un resumen reciente, véase de Bono, J. S. y Rowinsky, E. K. (2002), "The ErbB Receptor Family: A Therapeutic Target For Cancer", Trends in Molecular Medicine, 8, S 19-26.

Un conjunto de dianas prometedoras para la intervención terapéutica en el tratamiento del cáncer incluye los elementos del eje HER-cinasa. Frecuentemente, están regulados por incremento en tumores epiteliales sólidos de, a modo de ejemplo, la próstata, el pulmón y la mama, y también están regulados por incremento en tumores de glioblastoma. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un elemento del eje HER-cinasa, y ha sido la diana de elección para el desarrollo de varias terapias contra el cáncer diferentes. Los inhibidores de EGFR tirosina cinasa (EGFR-TKI) están entre estas terapias; dado que se requiere la fosforilación reversible de residuos de tirosina para la activación de la ruta de EGFR. En otras palabras, los EGFR-TKI bloquean un receptor de superficie celular responsable de desencadenar y/o mantener la ruta de señalización celular que induce crecimiento y división de células tumorales. Específicamente, se cree que estos inhibidores interfieren con el dominio cinasa de EGFR, denominado HER-1. Entre los EGFR-TKI más prometedores están tres series de compuestos: quinazolininas, piridopirimidinas y pirrolopirimidinas.

Dos de los compuestos más avanzados en el desarrollo clínico incluyen gefitinib (compuesto ZD1839 desarrollado por AstraZeneca UK Ltd.; disponible con el nombre comercial IRESSA; a continuación en el presente documento "IRESSA") y erlotinib (compuesto OSI-774 desarrollado por Genentech, Inc. y OSI Pharmaceuticals, Inc.; disponible con el nombre comercial TARCEVA; a continuación en el presente documento "TARCEVA"); ambos han generado resultados clínicos alentadores. El tratamiento del cáncer convencional tanto con IRESSA como con TARCEVA implica la administración oral, diaria de no más de 500 mg de los respectivos compuestos. En mayo de 2003, IRESSA se convirtió en el primero de estos productos que alcanzaba el mercado de los Estados Unidos, cuando se aprobó para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado.

IRESSA es una quinazolinina activa por vía oral que funciona inhibiendo directamente la fosforilación de tirosina cinasa sobre la molécula de EGFR. Compite por el sitio de unión a adenosina trifosfato (ATP), lo que conduce a la supresión del eje HER-cinasa. El mecanismo exacto de la respuesta de IRESSA no se entiende completamente, sin embargo, estudios sugieren que la presencia de EGFR es un prerrequisito necesario para su acción.

Una limitación significativa en el uso de estos compuestos es que los receptores de los mismos pueden desarrollar una resistencia a sus efectos terapéuticos tras responder inicialmente a la terapia, o pueden no responder a EGFR-TKI en ningún grado medible en absoluto. La tasa de respuesta a EGFR-TKI varía entre diferentes grupos étnicos. En el extremo inferior de los pacientes que responden a EGFR-TKI, en algunas poblaciones, sólo el 10-15 por ciento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado responden a inhibidores de EGFR cinasa. Por tanto, un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la sensibilidad a IRESSA y TARCEVA sería extremadamente beneficioso en el direccionamiento de la terapia a aquellos individuos que es más probable que se beneficien de una terapia de este tipo. El documento WO 03/103676 describe un método de tratamiento del cáncer en individuos que han desarrollado una resistencia a la terapia contra el cáncer con inhibidores de tirosina cinasa (TKI) convencionales o que no responden a los mismos desde el principio. El método incluye administrar a los pacientes una cantidad que supera la resistencia de un TKI, que puede administrarse con menos frecuencia que los tratamientos con TKI convencionales.

Existe una necesidad significativa en la técnica de un tratamiento del cáncer satisfactorio, y específicamente de cánceres de células epiteliales tales como cánceres de pulmón, ovarios, mama, cerebro, colon y próstata, que incorpore los beneficios de la terapia con TKI y supere la falta de respuesta mostrada por los pacientes. Un tratamiento de este tipo podría tener un impacto drástico sobre la salud de individuos, y especialmente individuos mayores, entre quienes el cáncer es especialmente común.

SUMARIO

La presente invención se define en y mediante las reivindicaciones adjuntas. Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que inhibidores irreversibles de EGFR son eficaces en el tratamiento del cáncer en sujetos que ya no responden más a terapias con gefitinib y/o erlotinib. Por tanto, en una realización, la presente invención permite un método para el tratamiento del cáncer resistente a gefitinib y/o erlotinib. En esta realización, se monitoriza la evolución del cáncer en un sujeto en un punto de tiempo tras haber iniciado el sujeto el tratamiento con gefitinib y/o erlotinib. La evolución del cáncer es indicativa de cáncer que es resistente al tratamiento con gefitinib y/o erlotinib y se administra al sujeto una composición farmacéutica que comprende un inhibidor irreversible del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

En realizaciones preferidas, el inhibidor irreversible de EGFR es EKB-569, HKI-272 o HKI-357. Alternativamente, el inhibidor irreversible de EGFR puede ser cualquier compuesto que se une a la cisteína 773 de EGFR.

La evolución del cáncer puede monitorizarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la evolución puede monitorizarse mediante inspección visual del cáncer, tal como, por medio de rayos X, tomografía computerizada o IRM. Alternativamente, la evolución puede monitorizarse mediante detección de biomarcadores tumorales.

En una realización, el paciente se monitoriza a diversos puntos de tiempo a lo largo de todo el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la evolución de un cáncer puede monitorizarse analizando la evolución del cáncer en un

segundo punto de tiempo y comparando este análisis con un análisis en un primer punto de tiempo. El primer punto de tiempo puede estar antes o después de la iniciación del tratamiento con gefitinib y/o erlotinib y el segundo punto de tiempo está después del primero. Un aumento del crecimiento del cáncer indica evolución del cáncer.

5 En una realización, la evolución del cáncer se monitoriza analizando el tamaño del cáncer. En una realización, el tamaño del cáncer se analiza mediante inspección visual del cáncer por medio de rayos X, tomografía computerizada o IRM. En una realización, el tamaño del cáncer se monitoriza mediante detección de biomarcadores tumorales.

10 En una realización, el cáncer es cáncer de células epiteliales. En una realización, el cáncer es cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer genito-urinario y cáncer de vejiga.

15 En una realización, el tamaño del cáncer se monitoriza en puntos de tiempo adicionales, y los puntos de tiempo adicionales están después del segundo punto de tiempo.

20 En una realización, el último punto de tiempo está al menos 2 meses después del punto de tiempo anterior. En una realización, el último punto de tiempo está al menos 6 meses después del punto de tiempo anterior. En una realización, el último punto de tiempo está al menos 10 meses después del punto de tiempo anterior. En una realización, el último punto de tiempo está al menos un año después del punto de tiempo anterior.

25 En otra realización, la presente invención permite un método de tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un sujeto que tiene una mutación en EGFR, concretamente, una sustitución de una treonina por una metionina en la posición 790 (T790M) de SEQ ID. No. 1, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor irreversible de EGFR. La mutación T790M confiere resistencia al tratamiento con gefitinib y/o erlotinib.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 Las figuras LA-IB muestran el análisis de secuencia de EGFR en lesiones metastásicas recurrentes de dos pacientes con CPCNP con resistencia a gefitinib adquirida. La figura IA muestra el análisis de secuencia para el caso 1. La mutación T790M en EGFR está presente en una lesión de hígado recurrente tras el desarrollo de resistencia clínica a gefitinib. (Izquierda) La mutación no se detectó en la lesión pulmonar primaria en el momento del diagnóstico. (Derecha) Tanto el tumor de pulmón primario como la lesión de hígado recurrente albergan la mutación de sensibilización a gefitinib L858R. Obsérvese que la mutación L858R está presente en la razón esperada para una mutación heterocigota tanto en lesiones primarias como recurrentes, mientras que T790M es detectable a bajos niveles en comparación con el alelo de tipo natural. Se muestra un polimorfismo (G/A) en el mismo trazado para demostrar la representación equivalente de los dos alelos en el producto de PCR no clonado. La figura 1B muestra el análisis de secuencia para el caso 2. La mutación T790M está presente dentro de una pequeña minoría de células resistentes a gefitinib. (Izquierda) La mutación T790M era indetectable o bien en tumor de pulmón primario o bien en ocho lesiones de hígado recurrentes de este caso secuenciando los productos de PCR no clonados. La heterocigosidad en un polimorfismo adyacente (G/A) confirma la amplificación de ambos alelos de EGFR de estas muestras. La mutación de sensibilización a gefitinib heterocigota, L861Q, se detectó en la razón esperada dentro del tumor de pulmón primario así como las ocho lesiones de hígado recurrentes.

35 Las figuras 2A-2C muestran la resistencia adquirida a gefitinib en líneas celulares de cáncer broncoalveolar y la sensibilidad persistente a inhibidores irreversibles de la familia de ERBB. La figura 2A muestra la inhibición por inhibidores de tirosina cinasa de la proliferación de líneas celulares de cáncer broncoalveolar con EGFR de tipo natural (NCI-H1666), la mutación de E746-A750 activante en EGFR (NCI-H1650), o dos subclones resistentes a gefitinib representativos de NCI-H1650 (G7 y C11). Se compara el efecto del inhibidor reversible gefitinib con el del inhibidor irreversible HKI-357. Se observaron resultados comparables con los otros inhibidores irreversibles. Se midieron los números de células mediante tinción con cristal violeta, tras cultivo en FCS al 5%, con EGFR 100 ng/ml, a las 72 h tras exposición a concentraciones de fármaco indicadas. Cada punto de datos representa la media de cuatro muestras. La figura 2B muestra la estructura química de gefitinib, un inhibidor reversible de EGFR; EKB-569, un inhibidor irreversible de EGFR; y HKI-272 y HKI-357, dos inhibidores duales irreversibles de EGFR y ERBB2. La figura 2C muestra la generación de células NCI-H1650 resistentes a fármaco tras el tratamiento con concentraciones variables de gefitinib o el inhibidor de ERBB irreversible EKB-569. Se tiñeron las colonias tras 12 días de cultivo en presencia de inhibidores.

40 Las figuras 3A-3D muestran la dependencia persistente de la señalización de EGFR y ERBB2 en células resistentes a gefitinib, y el tráfico de receptores alterado. La figura 3A muestra la viabilidad celular tras silenciamiento génico mediado por ARNiP de EGFR y ERBB2 en líneas celulares broncoalveolares con EGFR de tipo natural (NCI-H1666), en comparación con células con la mutación de E746-A750 activante en EGFR (NCI-H1650) y dos derivados resistentes a gefitinib (G7 y C11). Se contaron las células viables 72 h tras el tratamiento con ARN bicatenario y se muestran como una fracción con respecto a las células tratadas con ARNiP no específico, con desviaciones estándar

basadas en muestras por triplicado. La figura 3B muestra la inhibición de la autofosforilación de EGFR (Y1068) y la fosforilación de efectores aguas abajo AKT y MAPK (ERK) en células tratadas con concentraciones crecientes de gefitinib o el inhibidor irreversible HKI-357, seguido por un pulso de 2 h con EGF. La línea celular original NCI-H1650 se compara con una línea resistente a gefitinib representativa, G7. Se muestran AKT y MAPK totales como controles; se usa tubulina como control de carga para los niveles de EGFR totales, que están en el límite inferior de detección en estas células. La figura 3C muestra la internalización de EGFR alterada en células NCI-H1650 (G7) resistentes a gefitinib, en comparación con la línea celular original NCI-H1650 sensible. Se usa EGF etiquetado con rodamina para marcar EGFR a los 5 y 20 min., tras la adición del ligando. El aumento de la internalización de EGFR en células NCI-H1650 (G7) es más evidente a los 20 min. (microscopio Zeiss, 63 aumentos). La figura 3D muestra la inmunotransferencia de EGFR internalizado a partir de células originales NCI-H1650 y el derivado resistente G7 tras marcaje por pulsos de proteínas de superficie celular mediante biotilación y búsqueda durante 20 min. El aumento del EGFR intracelular en células NCI-H1650 (G7) se compara con la internalización del receptor de transferrina (TR) inalterado.

Las figuras 4A-4B muestran la eficacia de inhibidores irreversibles de ERBB en la supresión del mutante de EGFR T790M. La figura 4A muestra la comparación de gefitinib y dos inhibidores irreversibles, HKI-357 y HKI-272, en su capacidad para suprimir la autofosforilación de EGFR (Y1068) y la fosforilación de efectores aguas abajo AKT y MAPK (ERK) en la línea celular broncoalveolar NCI-H1975, que alberga tanto una mutación sensibilizante (L858R) como la mutación asociada a resistencia (T790M). Se muestran EGFR, AKT y MAPK totales como controles de carga. La figura 4B muestra la supresión de la proliferación en células NCI-H1975 que albergan las mutaciones L858R y T790M mediante tres inhibidores irreversibles de la familia de ERBB, en comparación con gefitinib.

La figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de EGFR.

La figura 6 muestra que al igual que gefitinib, HKI 357 y EKB 569 (marcado "Wyeth") demostraron un aumento de la destrucción celular de células de CPCNP que albergan una mutación de EGFR, pero a diferencia de gefitinib, los clones resistentes a estos fármacos no se generaron fácilmente *in vitro* y retuvieron su eficacia frente a clones resistentes a gefitinib.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Cánceres resistentes a gefitinib y erlotinib

Gefitinib (compuesto ZD 1839 desarrollado por AstraZeneca UK Ltd.; disponible con el nombre comercial IRESSA) y erlotinib (compuesto OSI-774 desarrollado por Genentech, Inc. y OSI Pharmaceuticals, Inc.; disponible con el nombre comercial TARCEVA) inducen respuestas clínicas drásticas en casos de cánceres de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) que albergan mutaciones activantes en el receptor de EGF (EGFR) (1-3), que estos inhibidores competitivos de unión a ATP seleccionan como diana (4, 5). La eficacia de estos inhibidores de tirosina cinasa puede resultar tanto de alteraciones en la hendidura del ATP asociadas a estas mutaciones, que conducen a una inhibición potenciada de la cinasa mutante mediante estos fármacos, como de la dependencia biológica de estas células cancerosas del aumento de señales de supervivencia transducidas por los receptores mutantes, un fenómeno descrito como "adicción oncogénica" (6, 7).

Aunque las respuestas terapéuticas tanto a gefitinib como a erlotinib pueden persistir durante tanto como 2-3 años, la duración media de la respuesta en la mayoría de casos de CPCNP es de sólo 6-8 meses (8-10). Los mecanismos que subyacen a la resistencia a fármacos adquirida no se entienden bien. Por analogía con imatinib (GLEEVEC), que inhibe la BCR-ABL cinasa implicada en leucemias mieloides crónicas (LMC), la C-KIT cinasa implicada en tumores estromales gastrointestinales (TEGI) y la FIP1L1-PDGFR- α cinasa en el síndrome hipereosinofílico idiopático (SHE), mutaciones del dominio cinasa secundario pueden suprimir posiblemente la unión al fármaco (11-16). Sin embargo, el CPCNP recurrente no se somete a biopsia fácilmente; por tanto están disponibles para análisis sólo muestras clínicas limitadas. Recientemente, se ha notificado una mutación secundaria individual, T790M, dentro del dominio cinasa de EGFR en tres de seis casos con enfermedad recurrente tras terapia con gefitinib o erlotinib (17, 18). El codón 315 de *BCR-ABL*, que es análogo al codón 790 de *EGFR*, está mutado frecuentemente en LMC resistente a imatinib (11,12), y la mutación del residuo correspondiente en *C-KIT* (codón 670) y *FIP1L1-PDGFR- α* (codón 674) está asociada con TEGI y BES resistentes a imatinib, respectivamente (15,16). El modelado *in vitro* temprano de la resistencia a inhibidores de EGFR indicó que la mutación del codón 790 dentro del receptor de tipo natural suprimiría de manera similar la inhibición mediante un inhibidor de EGFR tirosina cinasa (19). Recientemente, se demostró que proteínas de EGFR transfectadas que contienen mutaciones activantes junto con la sustitución T790M muestran inhibición reducida mediante gefitinib y erlotinib (17, 18). Aunque la mutación T790M parece contribuir a la resistencia adquirida en algunos casos de CPCNP, los mecanismos que subyacen al fracaso del tratamiento en casos que carecen de mutaciones de EGFR secundarias permanecen sin explicación.

A diferencia de la BCR-ABL cinasa citoplásmica, la señalización por EGFR unido a membrana implica una ruta compleja de unión al ligando, homodimerización del receptor y heterodimerización con ERBB2 y otros miembros de la familia, seguido por internalización y reciclaje del receptor unido al ligando o degradación del receptor mediada

por ubiquitina (20). Se cree que se produce señalización dependiente de EGF significativa durante el proceso de internalización, que está asociado también con la disociación de complejos de EGFR al pH bajo de las vesículas intracelulares. Como tales, múltiples factores modulan la intensidad y la calidad de la señal traducida por el receptor, y se han vinculado de manera estrecha alteraciones en el tráfico de EGFR con la regulación de respuestas celulares dependientes de EGF (20).

La presente invención se basa en el descubrimiento de que cánceres resistentes a gefitinib pueden incluir aquéllos en los que la mutación de EGFR T790M sólo está presente en un subconjunto de células tumorales resistentes y aquéllos en los que no se observa la mutación T790M, pero se observa aumento de la internalización de EGF. La invención se basa además en el descubrimiento de que inhibidores irreversibles de EGFR, que reticulan de manera covalente el receptor, son eficaces en la inhibición de cánceres con la mutación T790M y en cánceres con tráfico de EGFR alterado que pueden hacer que tales cánceres sean resistentes al tratamiento con gefitinib y/o erlotinib. Por consiguiente, la presente invención permite un método de tratamiento de cánceres resistentes a gefitinib y/o erlotinib que comprende administrar inhibidores irreversibles de EGFR.

Método de tratamiento de un paciente

En una realización, la invención permite un método para tratar cáncer resistente a gefitinib/erlotinib. El método comprende administrar a un paciente que necesita un tratamiento de este tipo una cantidad eficaz de determinados inhibidores irreversibles de EGFR, incluyendo Eke-569 (4-anilinoquinolina-3-carbonitrilo; Greenberger *et al.*, 11^a NCI-EORTC-AACR Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, Amsterdam, 7-10 de noviembre de 2000, resumen 388; Wyeth), HKI-357 (un derivado de 4-anilinoquinolina-3-carbonitrilo; Tsou *et al.* J. Med. Chem. 2005, 48: 1107-1131; Wyeth) y/o HKI-272 (un derivado de 4-anilinoquinolina-3-carbonitrilo; Rabindran *et al.*, Cancer Res. 2004, 64, 3958-3965; Wyeth). En una realización preferida, la invención permite un método que comprende administrar a un paciente que necesita un tratamiento de este tipo una cantidad eficaz de EKB-569. En una realización preferida, la invención permite un método que comprende administrar a un paciente que necesita un tratamiento de este tipo una cantidad eficaz de HKI-357.

El tratamiento también puede implicar una combinación de tratamientos, incluyendo, pero sin limitarse a un inhibidor de tirosina cinasa en combinación con otros inhibidores de tirosina cinasa, quimioterapia, radiación, etc.

Los cánceres pueden diagnosticarse inicialmente como sensibles a gefitinib/erlotinib o predecirse que van a ser sensibles a gefitinib/erlotinib mediante los métodos descritos en Lynch *et al.*, 2004; 350:2129-2139. Puede predecirse la sensibilidad a gefitinib/erlotinib por la presencia en el tumor de mutaciones de EGFR que incluyen, por ejemplo, delección de los residuos 747 (lisina) a 749 (ácido glutámico) combinada con una mutación en 750 (alanina), delección de los residuos 747 (lisina) a 750 (alanina), sustitución de leucina por arginina en el residuo 858, sustitución de leucina por glutamina en el residuo 861.

Los cánceres pueden diagnosticarse como resistentes a gefitinib y/o erlotinib tras haberse comenzado el tratamiento con gefitinib y/o erlotinib. Alternativamente, los cánceres pueden diagnosticarse como resistentes a gefitinib y/o erlotinib antes de la iniciación del tratamiento con tales compuestos. La resistencia a gefitinib y/o erlotinib en el tumor pueden producirse tras, por ejemplo, 6 meses o más de tratamiento con gefitinib y/o erlotinib. Alternativamente, la resistencia a gefitinib y/o erlotinib del tumor puede diagnosticarse menos de 6 meses tras haberse comenzado el tratamiento con gefitinib y/o erlotinib. El diagnóstico de la resistencia a gefitinib y/o erlotinib puede lograrse mediante la monitorización de la evolución del tumor durante el tratamiento con gefitinib y/o erlotinib. La evolución del tumor puede determinarse mediante la comparación del estado del tumor entre puntos de tiempo tras haberse comenzado el tratamiento o mediante la comparación del estado del tumor entre un punto de tiempo tras haberse comenzado el tratamiento y un punto de tiempo antes de la iniciación del tratamiento con gefitinib y/o erlotinib. La evolución del tumor puede monitorizarse durante el tratamiento con gefitinib y/o erlotinib de manera visual, por ejemplo, por medio de radiografía, por ejemplo, rayos x, tomografía computerizada, u otros métodos de monitorización conocidos por el experto, incluyendo palpación del cáncer o métodos para monitorizar los niveles de biomarcadores tumorales. La evolución del cáncer durante el tratamiento con gefitinib y/o erlotinib indica resistencia a gefitinib y/o erlotinib. Un aumento del nivel de biomarcadores tumorales indica evolución del tumor. Por tanto, un aumento de los niveles de biomarcadores tumorales durante el tratamiento con gefitinib y/o erlotinib indica resistencia a gefitinib y/o erlotinib. La detección de nuevos tumores o la detección de metástasis indica evolución del tumor. El cese de la contracción del tumor indica evolución del tumor. El crecimiento del cáncer viene indicado mediante, por ejemplo, el aumento del tamaño del tumor, la metástasis o la detección de nuevo cáncer y/o un aumento de los niveles de biomarcadores tumorales.

El desarrollo de resistencia a gefitinib y/o erlotinib puede monitorizarse por medio de pruebas para detectar la presencia de una mutación asociada a resistencia a gefitinib y/o erlotinib en células tumorales circulantes obtenidas de la circulación, u otro líquido corporal, del sujeto. La presencia de mutaciones asociadas a resistencia a gefitinib y/o erlotinib en células tumorales del sujeto es indicativa de un tumor resistente a gefitinib y/o erlotinib.

En una realización, el tumor del sujeto alberga mutaciones indicativas de sensibilidad a gefitinib y/o erlotinib, todavía es resistente al tratamiento con gefitinib y/o erlotinib. En una realización, el tumor del sujeto alberga mutaciones

indicativas de sensibilidad a gefitinib y/o erlotinib y alberga mutaciones indicativas de resistencia a gefitinib y/o erlotinib, por ejemplo, la mutación T790M, es decir, cuando se sustituye el residuo de treonina nativo por un residuo de metionina, en EGFR, por ejemplo aumento de la internalización de EGFR. En una realización, el tumor del sujeto no alberga mutaciones indicativas de sensibilidad a gefitinib y/o erlotinib y no alberga mutaciones indicativas de resistencia a gefitinib y/o erlotinib, por ejemplo, la mutación T790M en EGFR, por ejemplo, aumento de la internalización de EGFR.

Con respecto a la administración del fármaco, una "cantidad eficaz" indica una cantidad que da como resultado un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de pacientes, tal como una mejora de los síntomas, una cura, una reducción de la carga de enfermedad, reducción de la masa tumoral o los números de células, extensión de la vida, mejora de la calidad de vida, u otro efecto reconocido generalmente como positivo por médicos familiarizados con el tratamiento del tipo particular de enfermedad o afección.

La dosificación eficaz del principio activo empleado puede variar dependiendo del compuesto particular empleado, el modo de administración y la gravedad del estado que va a tratarse. El experto es conciente de la dosis eficaz para cada paciente, que puede variar con la gravedad de la enfermedad, variación genética individual o tasa metabólica. Sin embargo, en general, se obtienen resultados satisfactorios cuando se administran los compuestos de la invención en una dosificación diaria de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal, administrados opcionalmente en dosis divididas de dos a cuatro veces al día, o en una forma de liberación sostenida. Se pronostica que la dosificación diaria total es de desde aproximadamente 1 hasta 1000 mg, preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta 500 mg. Formas farmacéuticas adecuadas para uso interno comprenden desde aproximadamente 0,5 hasta 1000 mg del compuesto activo en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable sólido o líquido. Este régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse diariamente varias dosis divididas o la dosis puede reducirse proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

La vía de administración puede ser intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.), intratecal (i.t.), intrapleural, intrauterina, rectal, vaginal, tópica, intratumoral y similares. Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual a lo largo del tiempo y pueden suministrarse por medios peristálticos.

La administración puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación agentes de penetración apropiados para la barrera que va a permearse. Tales agentes de penetración se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa derivados de ácido fusídico y sales biliares. Además, pueden usarse detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede ser mediante pulverizadores nasales, por ejemplo, o usando supositorios. Para la administración oral, los compuestos de la invención se formulan en formas de administración oral convencional tales como cápsulas, comprimidos y tónicos.

Para la administración tópica, la composición farmacéutica (inhibidor de la actividad cinasa) se formula en pomadas, bálsamos, geles, o cremas, tal como se conoce generalmente en la técnica.

Las composiciones terapéuticas de esta invención, por ejemplo inhibidores irreversibles de EGFR, se administran convencionalmente por vía intravenosa, como por ejemplo, mediante inyección de una dosis unitaria. La expresión "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con los diluyentes requeridos; es decir, portador o vehículo.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que va a administrarse y el horario dependen del sujeto que va a tratarse, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el principio activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas del principio activo requerido que va a administrarse dependen del criterio del médico y son peculiares para cada individuo.

Las composiciones terapéuticas útiles para poner en práctica los métodos de la presente invención, por ejemplo inhibidores irreversibles de EGFR, se describen en el presente documento. Puede usarse cualquier formulación o sistema de administración de fármacos que contenga los principios activos, que sea adecuado para el uso previsto, tal como conocen generalmente los expertos en la técnica. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para administración oral, rectal, tópica o parenteral (incluyendo por inhalación, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular y intravenosa) los conocen los expertos en la técnica. El portador debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para receptor de la misma.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de las mismas, cuando se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y

reactivos, se usan de manera intercambiable y representan que los materiales pueden administrarse a un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseados.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen convenientemente una preparación acuosa estéril del compuesto activo que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Por tanto, tales formulaciones pueden contener convenientemente agua destilada, dextrosa al 5% en agua destilada o solución salina. Las formulaciones útiles incluyen también disoluciones concentradas o sólidos que contienen el compuesto que tras la dilución con un disolvente apropiado proporcionan una disolución adecuada para la administración parenteral anterior.

Para la administración entérica, puede incorporarse un compuesto en un portador inerte en unidades diferenciadas tales como cápsulas, cachets, comprimidos o pastillas para chupar, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del compuesto activo; como un polvo o gránulos; o una suspensión o disolución en un líquido acuoso o líquido no acuoso, por ejemplo, un jarabe, un elixir, una emulsión o una pócima. Portadores adecuados puede ser almidones o azúcares e incluyen lubricantes, aromatizantes, aglutinantes, y otros materiales de la misma naturaleza.

Puede prepararse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Pueden prepararse comprimidos comprimidos mediante compresión en una máquina adecuada del compuesto activo en una forma de flujo libre, por ejemplo un polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con componentes accesorios, por ejemplo, aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, o agentes tensioactivos o de dispersión. Pueden prepararse comprimidos moldeados mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto activo en polvo con cualquier portador adecuado.

Puede prepararse un jarabe o una suspensión añadiendo el compuesto activo a una disolución acuosa, concentrada de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, a la que puede añadirse cualquier componente accesorio. Tales componentes accesorios pueden incluir aromatizante, un agente que retarda la cristalización del azúcar o un agente que aumenta la solubilidad de cualquier otro componente, por ejemplo, como un alcohol polihidroxilado, por ejemplo, glicerol o sorbitol.

Pueden presentarse formulaciones para administración rectal como un supositorio con un portador convencional, por ejemplo, manteca de cacao o Witepsol S55 (marca comercial de Dynamite Nobel Chemical, Alemania), para una base de supositorio.

Pueden presentarse formulaciones para administración oral con un potenciador. Los potenciadores de la absorción aceptables por vía oral incluyen tensioactivos tales como laurilsulfato de sodio, palmitoil-carnitina, Laureth-9, fosfatidilcolina, ciclodextrina y derivados de la misma, sales biliares tales como desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicolato de sodio y fusidato de sodio; agentes quelantes incluyendo EDTA, ácido cítrico y salicilatos; ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, acilcarnitinas, mono y diglicéridos). Otros potenciadores de la absorción oral incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, CHAPS (3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfonato), Big-CHAPS (N,N-bis(3-D-gluconamidapropil)-colamida), clorobutanol, octoxinol-9, alcohol bencílico, fenoles, cresoles y alcoholes alquílicos. Un potenciador de la absorción oral especialmente preferido para la presente invención es laurilsulfato de sodio.

Alternativamente, el compuesto puede administrarse en liposomas o microesferas (o micropartículas). Los expertos en la técnica conocen bien métodos para preparar liposomas y microesferas para su administración a un paciente. La patente estadounidense n.º 4.789.734 describe métodos para encapsular materiales biológicos en liposomas. Esencialmente, el material se disuelve en una disolución acuosa, se añaden los fosfolípidos y lípidos apropiados, junto con tensioactivos si se requiere, y el material se somete a diálisis o sonicación, según sea necesario. Se proporciona una revisión de métodos conocidos por G. Gregoriadis, capítulo 14, "Liposomes," *Drug Carriers in Biology and Medicine*, págs. 287-341 (Academic Press, 1979).

Los expertos en la técnica conocen bien microesferas formadas por polímeros o proteínas, y pueden adaptarse para el paso a través del tracto gastrointestinal directamente al torrente sanguíneo. Alternativamente, el compuesto puede incorporarse y las microesferas, o el material compuesto de microesferas, implantarse para su liberación lenta a lo largo de un periodo de tiempo que oscila desde días hasta meses. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.906.474, 4.925.673 y 3.625.214, y Jein, *TIPS* 19:155-157 (1998).

En una realización, el inhibidor de tirosina cinasa de la presente invención puede formularse en un liposoma o una micropartícula que se dimensiona de manera adecuada para depositarse en lechos capilares tras la administración intravenosa. Cuando el liposoma o la micropartícula se deposita en los lechos capilares que rodean el tejido isquémico, los agentes pueden administrarse localmente al sitio en el que pueden ser más eficaces. Liposomas adecuados para seleccionar como diana tejido isquémico tienen generalmente menos de aproximadamente 200 nanómetros y son también normalmente vesículas unilamelares, tal como se da a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.593.688 concedida a Baldeschweiler, titulada "Liposomal targeting of ischemic tissue".

Micropartículas preferidas son las preparadas a partir de polímeros biodegradables, tales como poliglicolida, polilactida y copolímeros de las mismas. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente un sistema portador apropiado dependiendo de diversos factores, incluyendo la tasa de liberación de fármaco deseada y la dosificación deseada.

5 En una realización, las formulaciones se administran por medio de un catéter directamente al interior de los vasos sanguíneos. La administración puede producirse, por ejemplo, a través de orificios en el catéter. En las realizaciones en las que los compuestos activos tienen una semivida relativamente larga (del orden de 1 día a una semana o más) las formulaciones pueden incluirse en hidrogeles poliméricos biodegradables, tales como los dados a conocer en la
10 patente estadounidense n.º 5.410.016 concedida a Hubbell *et al.* Estos hidrogeles poliméricos pueden administrarse al interior de la luz de un tejido y liberarse los compuestos activos a lo largo del tiempo a medida que el polímero se degrada. Si se desea, los hidrogeles poliméricos pueden tener micropartículas o liposomas que incluyen el compuesto activo dispersado en los mismos, proporcionando otro mecanismo para la liberación controlada de los compuestos activos.

15 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner el compuesto activo en asociación con un portador que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente el compuesto activo en asociación con un portador líquido o un portador sólido finamente dividido y entonces, si es necesario, conformando el producto para dar la forma farmacéutica unitaria deseada.

20 Las formulaciones pueden incluir además uno o más componente(s) accesorio(s) opcional(es) utilizado(s) en la técnica de formulaciones farmacéuticas, por ejemplo, diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, agentes de suspensión, conservantes (incluyendo antioxidantes) y similares.

25 Los compuestos de los presentes métodos (es decir, inhibidores irreversibles de EGFR) pueden presentarse para su administración al tracto respiratorio como un rapé o un aerosol o una disolución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte tal como lactosa. En un caso de este tipo, las partículas del compuesto activo tienen adecuadamente diámetros de menos de 50 micras, preferiblemente menos de 10 micras, más preferiblemente entre 2 y 5 micras.

30 Generalmente para la administración nasal se preferirá un pH ligeramente ácido. Preferiblemente, las composiciones de la invención tienen un pH de desde aproximadamente 3 hasta 5, más preferiblemente desde aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 3,9 y lo más preferiblemente 3,7. El ajuste del pH se logra mediante la adición de un ácido apropiado, tal como ácido clorhídrico.

35 La preparación de una composición farmacológica que contiene principios activos disueltos o dispersados en la misma se entiende bien en la técnica y no necesita limitarse basándose en la formulación. Normalmente, se preparan tales composiciones como preparaciones inyectables o bien como disoluciones líquidas o bien suspensiones, sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución, o suspensiones, en líquido antes de su uso. La preparación también puede emulsionarse.

40 El principio activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y similares que potencian la eficacia del principio activo.

45 Los inhibidores irreversibles de cinasa de la presente invención pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de los mismos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína y similares.

50 Se conocen bien en la técnica portadores fisiológicamente tolerables. Portadores líquidos a modo de ejemplo son disoluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Todavía adicionalmente, los portadores acuosos pueden contener más de una sal de tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos.

55 Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y la exclusión de agua. Ejemplos de

tales fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de agua-aceite.

Definiciones:

5 Las expresiones “ErbB 1”, “receptor del factor de crecimiento epidérmico” y “EGFR” se usan de manera intercambiable en el presente documento y hacen referencia a la secuencia nativa de EGFR tal como se da a conocer, por ejemplo, en Carpenter *et al.* Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), incluyendo variantes de la misma (por ejemplo un mutante de delección de EGFR como en Humphrey *et al.* PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). erbB1 se refiere al gen que codifica para el producto proteico de EGFR. Tal como se usa en el presente documento, la proteína EGFR se da a conocer como el n.º de registro de GenBank NP_005219 (SEQ ID NO: 1) que está codificada por el gen erbB1, n.º de registro de GenBank NM_005228 (SEQ ID NO: 2). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de erbB1/EGFR pueden encontrarse en la figura 5.

15 La expresión “varianza de ácidos nucleicos que aumenta la actividad cinasa” tal como se usa en el presente documento se refiere a una varianza (es decir, mutación) en la secuencia de nucleótidos de un gen que da como resultado un aumento de la actividad cinasa. El aumento de la actividad cinasa es un resultado directo de la varianza en el ácido nucleico y está asociada con la proteína para la que el gen codifica.

20 El término “fármaco” o “compuesto” tal como se usa en el presente documento se refiere a una entidad química o producto biológico, o combinación de entidades químicas o productos biológicos, administrados a una persona para tratar o prevenir o controlar una enfermedad o un estado. La entidad química o producto biológico es preferiblemente, pero no necesariamente un compuesto de bajo peso molecular, pero también puede ser un compuesto más grande, por ejemplo, un oligómero de ácidos nucleicos, aminoácidos o hidratos de carbono incluyendo sin limitación proteínas, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, glicoproteínas, ARNip, lipoproteínas, aptámeros, y modificaciones y combinaciones de los mismos.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos “eficaz” y “eficacia” incluyen tanto eficacia farmacológica como seguridad fisiológica. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del tratamiento para dar como resultado un efecto biológico deseado en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad, u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, orgánico y/o de organismo (a menudo denominados efectos secundarios) que resultan de la administración del tratamiento. “Menos eficaz” significa que el tratamiento da como resultado un nivel terapéuticamente significativo inferior de eficacia farmacológica y/o un nivel terapéuticamente mayor de efectos fisiológicos adversos.

30 Pueden aislarse moléculas de ácido nucleico a partir de una muestra biológica particular usando cualquiera de varios procedimientos, que se conocen bien en la técnica, siendo el procedimiento de aislamiento particular elegido apropiado para la muestra biológica particular. Por ejemplo, pueden ser útiles procedimientos de lisis alcalina y congelación-descongelación para obtener moléculas de ácido nucleico de materiales sólidos; pueden ser útiles procedimientos de lisis alcalina y calor para obtener moléculas de ácido nucleico de orina, y puede usarse extracción con proteinasa k para obtener ácido nucleico de sangre (Rolff, A *et al.* PCR: Clinical Diagnostics and Research, Springer (1994)).

35 Tal como se usa en el presente documento, un “cáncer” en un sujeto o paciente se refiere a la presencia de células que tienen características típicas de células que provocan cáncer, tales como proliferación no controlada, inmortalidad, potencial metastásico, tasa de proliferación y crecimiento rápida, y determinadas características morfológicas características. En algunas circunstancias, las células cancerosas estarán en forma de un tumor, o tales células pueden existir localmente dentro de un animal, o circular en el torrente sanguíneo como células independientes.

50 EJEMPLOS

Compuestos. Compuestos usados en el presente documento, incluyendo EKB-569, HK1-357 y HK1-272 tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.002.008; Greenberger *et al.*, Proc. 11^a NCI EORTC-AACR Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, Clinical Cancer Res. Suplemento vol. 6, noviembre de 2000, ISSN 1078-0432; en Rabindran *et al.*, Cancer Res. 64: 3958-3965 (2004); Holbro y Hynes, Ann. Rev. Pharm. Tox. 44:195-217 (2004); y Tejpar *et al.*, J. Clin. Oncol. ASCO Annual Meeting Proc. vol. 22, n.º 14S: 3579 (2004).

60 **Análisis de CPCNP recurrente y generación de células NCI-H1650 resistentes a gefitinib.** Se obtuvieron muestras clínicas de CPCNP recurrente en autopsia tras el consentimiento apropiado. Se secuenció el dominio cinasa completo de *EGFR* tras el análisis de productos de PCR no clonados. Se secuenciaron múltiples clones del exón 20 para examinar el codón 790. Se realizó análisis mutacional de *EGFR* (exones 1-28), *ERBB2* (exones 1-24), *PTEN* (exones 1-9), *Kras* (codones 12, 13 y 61) y *p53* (exones 5-8) en clones resistentes a gefitinib así como la línea celular NCI-H1650 original mediante la secuenciación automática de exones individuales y la secuencia intrónica flanqueantes (condiciones de PCR disponibles a petición) con secuenciación bidireccional usando química de terminador de tinte (BIGDYE versión 1.1, Applied Biosystems). Se ejecutaron las reacciones de secuenciación en un

secuenciador ABI3100 (Applied Biosystems) y se analizaron los electroferogramas usando el software SEQUENCE NAVIGATOR y FACTURA (Applied Biosystems).

Para generar subclones resistentes de células NCI-H1650, éstas se trataron con metanosulfonato de etilo (EMS; 600 µg/ml), se dejaron recuperar durante 72 h y entonces se sembraron a una densidad de 6×10^4 células por placa de 10 cm² en gefitinib 20 µM. Se logró la resistencia relativa de estas células a gefitinib, en comparación con los inhibidores irreversibles, sembrando 5×10^4 células en placas de seis pocillos en FCS al 5% y EGF 100 ng/ml (Sigma), en presencia de concentraciones variables de fármacos, seguido tras 72 h por fijación de las células con formaldehído al 4%, tinción con cristal violeta al 0,1% y cuantificación de la masa celular usando el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Para experimentos de silenciamiento génico con ARN de interferencia pequeño (ARNip), se transfectaron las células con oligonucleótidos de ARN bicatenario que seleccionan como diana *EGFR*, *ERBB2* (ambos SMARTpool de Dharmacon, Lafayette, CO), o control no específico (LRT1B), usando el reactivo de transfección X-treme GENE (Roche Applied Science). Tras 72 h, se tiñeron las células con cristal violeta y se analizaron en el escáner infrarrojo Odyssey.

Inmunotransferencia y estudios de señalización. Se determinó la inhibición de la señalización de EGFR mediante concentraciones crecientes de gefitinib o los inhibidores irreversibles sembrando 9×10^4 células en placas de 24 pocillos, añadiendo los fármacos a medio que contiene FCS al 5% durante 15 min., seguido por un pulso de 2 h con EGF 100 ng/ml, y recogiendo los lisados. Se prepararon los lisados en tampón de carga de gel 2x, se sometieron a sonicación, a ebullición y entonces se separaron mediante SDS/PAGE al 10%, seguido por electrotransferencia a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), e inmunotransferencia. Los anticuerpos usados fueron fosfo-EGFR Y1068 y fosfo-proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), fosfo-AKT (BioSource International, Camarillo, CA), y EGFR, MAPK, AKT totales, y tubulina (Santa Cruz Biotechnology).

Análisis de la internalización de EGFR. Para demostrar la internalización de EGFR mediante microscopía de fluorescencia, se hicieron crecer células sobre cubreobjetos y se incubaron con EGF humano recombinante (hr) 1 ng/ml (Molecular Probes, Eugene, OR) para diversos intervalos antes de fijar en paraformaldehído al 4% durante 10 min. Se lavaron los cubreobjetos en PBS y se montaron en reactivo de montante de fluorescencia ProLong Gold (Molecular Probes). Para cuantificar la internalización de EGFR mediante biotinylación de la superficie celular, se hicieron crecer las células hasta la confluencia, se trataron previamente con ciclohexamida, se incubaron en hielo durante 1 h con sulfosuccinimidil-2-(biotinamido)etil-1,3-ditiopropionato 1,5 mg/ml (sulfo-NHS-SS-biotina; Pierce) y se lavaron con tampón de bloqueo (NH₄Cl 50 mM/MgCl₂ 1 mM/CaCl₂ 0,1 mM en PBS) hasta extinguir la sulfo-NHS-SS-biotina libre, seguido por varios lavados adicionales con PBS. Entonces, se incubaron las células en el medio de cultivo a 37°C para diversos intervalos para permitir la internalización de las moléculas biotiniladas, se lavaron dos veces durante 20 min. en una disolución de glutatión (glutatión 50 mM/NaCl 75 mM/NaOH 75 mM/BSA al 1%) en hielo para separar todos los grupos biotinilo de la superficie celular, y entonces se rasparon y se lisaron en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) 500 µM (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, con NaCl 150 mM/SDS al 0,1%/Triton X-100 al 1%) complementado con NaF, ortovanadato de Na e inhibidores de proteasas. Se centrifugaron los extractos celulares y se incubaron los sobrenadantes con perlas de estreptavidina (Sigma) para recoger las proteínas biotiniladas, que entonces se analizaron mediante SDS/PAGE e inmunotransferencia con anticuerpo anti-EGFR (SC-03, Santa Cruz Biotechnology) o anticuerpo contra el receptor de transferrina (Santa Cruz Biotechnology).

Resultados y discusión

Análisis de cánceres de pulmón recurrentes con resistencia a gefitinib adquirida. CPCNP resistente a gefitinib recurrente desarrollado en dos pacientes cuyos tumores habían albergado una mutación activante de la EGFR cinasa en el momento del diagnóstico y quienes habían mostrado una respuesta clínica inicial drástica al fármaco (1). En ambos casos, la enfermedad metastásica progresiva en el hígado condujo al fallecimiento de los pacientes, 1-2 años tras la iniciación del tratamiento. En el caso 1, el análisis de la metástasis de hígado principal obtenida en el momento de la autopsia indicó la persistencia de la mutación de *EGFR* sensibilizante (L858R), así como la presencia de una mutación T790M recién adquirida (figura 1A). De manera interesante, el análisis de productos de PCR no clonados mostró que la mutación L858R inicial estaba presente en una abundancia consecuente con una mutación heterocigota que está presente en todas las células tumorales, mientras que se observó la mutación T790M secundaria a aproximadamente un quinto de la abundancia del alelo de tipo natural correspondiente. Por tanto, esta mutación asociada a resistencia parece estar presente en sólo una fracción de células dentro del tumor recurrente.

El caso 2 implicó ocho metástasis recurrentes distintas en el hígado tras el fracaso de la terapia con gefitinib. En todas estas lesiones independientes, estaba presente la mutación sensibilizante L861Q de *EGFR* a la razón esperada para una mutación heterocigota. No pudo detectarse ninguna mutación de *EGFR* secundaria mediante el análisis de productos de PCR no clonados a partir de cualquiera de estas metástasis. Sin embargo, tras la subclonación de los productos de PCR, se descubrió que la mutación T790M estaba presente a muy baja frecuencia en dos de los cuatro tumores metastásicos analizados (T790M, 2 de 50 clones secuenciados de la lesión 1 y 1 de 56 de la lesión 2), pero no a partir de otras dos metástasis recurrentes (0 de 55 clones de la lesión 3 y 0 de 59 de la lesión 4), o el tumor primario (0 de 75 clones) (figura 1B y tabla 1). En conjunto, estos resultados concuerdan con

informes anteriores de que la mutación T790M está presente en algunos, pero no todos, los casos de resistencia a gefitinib adquirida (tres de siete tumores; véanse las referencias 17, 18 y 21). Además, tal como se indicó anteriormente (18), incluso en algunos casos con esta mutación asociada a resistencia, parece estar presente en sólo una pequeña fracción de células tumorales dentro de una lesión recurrente. Estas observaciones sugieren que están implicados mecanismos adicionales de resistencia en casos sin una mutación de *EGFR* secundaria y que tales mecanismos coexisten con la mutación T790M en otros casos.

Generación de líneas celulares resistentes a gefitinib con susceptibilidad a inhibidores irreversibles. Dada la excelente correlación entre la receptividad clínica de CPCNP con mutante de *EGFR* y la sensibilidad a gefitinib potenciada de líneas celulares de CPCNP con estas mutaciones (2, 6, 22, 23), y la disponibilidad limitada de muestras clínicas de pacientes con recidiva, se modeló la resistencia a gefitinib *in vitro*. Se cultivó la línea celular de cáncer broncoalveolar NCI-H1650, que tiene una delección en marco de la *EGFR* cinasa (delE746-A750), en gefitinib 20 μ M, o bien con o bien sin exposición previa al mutágeno metanosulfonato de etilo. Esta línea celular muestra un aumento de sensibilidad de 100 veces a gefitinib, en comparación con algunas líneas de CPCNP que expresan *EGFR* de tipo natural (6). Mientras que la gran mayoría de estas células se destruyen de manera eficaz mediante gefitinib 20 μ M, se observaron fácilmente colonias resistentes a fármaco a una frecuencia de $\approx 10^{-5}$, independientemente del tratamiento con mutágeno. Se aislaron cuarenta y nueve clones resistentes a fármaco independientes, mostrando una disminución promedio de 50 veces en la sensibilidad a gefitinib (figura 2A). Todos estos mostraron persistencia de la mutación sensibilizante sin expresión alterada de *EGFR*, y ninguno había adquirido una mutación de *EGFR* secundaria o nuevas mutaciones en *ERBB2*, *p53*, *Kras* o *PTEN*. Los clones resistentes a gefitinib demostraron una resistencia comparable a inhibidores relacionados de la clase de anilinoquinazolina. Notablemente, sin embargo, presentaron sensibilidad persistente a tres inhibidores de la familia de *ERBB* (figura 2A): HKI-272 (24) y HKI-357 (compuesto 7f en la referencia 25), que son inhibidores duales de *EGFR* y *ERBB2* (valores de CI_{50} de 92 y 34 nM, respectivamente, para *EGFR* y 59 y 33 nM, respectivamente, para *ERBB2*), y EKB-569 (26), un inhibidor selectivo de *EGFR* (valores CI_{50} de 39 nM para *EGFR* y 1,3 μ M para *ERBB2*) (Wyeth) (figura 2B). Los tres fármacos son inhibidores irreversibles, lo más probablemente por medio de un enlace covalente con el residuo cys773 dentro del dominio catalítico de *EGFR* o la cys805 de *ERBB2*. Como gefitinib, estos compuestos demostraron aumento de la destrucción de células de CPCNP que albergan una mutación de *EGFR*, en comparación con células que expresan el receptor de tipo natural (figura 2A). Sin embargo, a diferencia de gefitinib, contra el que se generan fácilmente clones resistentes, incluso a altas concentraciones de fármaco, no se pudo establecer clones de células que fuesen resistentes a los inhibidores irreversibles a concentraciones por encima de 10 μ M, incluso tras mutagénesis con metanosulfonato de etilo (figura 2C).

Dependencia de células resistentes a gefitinib de la expresión de *EGFR* y *ERBB2*. Para llegar a comprender bien los mecanismos que subyacen a la adquisición de resistencia a gefitinib y la sensibilidad persistente a los inhibidores irreversibles, en primer lugar se determinó si las líneas celulares resistentes siguen siendo dependientes de *EGFR* para su viabilidad. Se ha mostrado anteriormente que el silenciamiento génico mediado por ARNip de *EGFR* desencadena la apoptosis en células que albergan *EGFR* mutantes, pero no en aquéllas con alelos de tipo natural (6). Significativamente, las células NCI-H1650 originales así como sus derivados resistentes a gefitinib mostraron una reducción comparable en la viabilidad celular tras la transfección con ARNip que selecciona como diana *EGFR* (figura 3A). Por tanto, la adquisición de resistencia a gefitinib no implica activación independiente de *EGFR* de efectores aguas abajo. Debido a que HKI-272 y HKI-357 seleccionan ambos como diana *EGFR* y *ERBB2*, también se sometió a prueba la supresión de este receptor relacionado. El silenciamiento génico de *ERBB2* en NCI-H1650 y sus derivados resistentes a gefitinib también provocó pérdida de viabilidad (figura 3A), lo que sugiere un papel para los heterodímeros *EGFR-ERBB2* en la traducción de señales de supervivencia esenciales en células tumorales que albergan mutaciones de *EGFR*. La inhibición de *EGFR* solo mediante un inhibidor irreversible parece ser suficiente para inducir la apoptosis en células resistentes a gefitinib, tal como se demuestra mediante la eficacia de EKB-569, que selecciona como diana principalmente *EGFR* (26). Sin embargo, dados los efectos posiblemente complementarios de la selección como diana tanto de *EGFR* como de *ERBB2* usando ARNip y la disponibilidad de inhibidores irreversibles que seleccionan como diana ambos miembros de esta familia, el posible beneficio de la inhibición dual justifica su consideración.

Se comparó la capacidad de gefitinib e inhibidores irreversibles de la familia de *ERBB* para suprimir la señalización mediante efectores aguas abajo de *EGFR* que median sus rutas proliferativas y de supervivencia. HKI-357 fue 10 veces más eficaz que gefitinib en la supresión de la autofosforilación de *EGFR* (medida en el residuo Y1068), y la fosforilación de *AKT* y *MAPK* en células NCI-H1650 originales que albergan la mutación de *EGFR* de1E746-A750 (figura 3B). En un derivado resistente a gefitinib, NCI-H 1650 (G7), gefitinib mostró una eficacia considerablemente reducida en la supresión de la fosforilación de *AKT*, un efector de la señalización de *EGFR* clave vinculado a la receptividad a gefitinib (6), mientras que HKI-357 demostró actividad persistente (figura 3B).

Internalización de *EGFR* alterada en clones resistentes a gefitinib. Dada la ausencia de mutaciones secundarias en *EGFR* y la susceptibilidad persistente de células resistentes a gefitinib a supresión mediada por ARNip de *EGFR*, se sometió a prueba si el mecanismo que subyace a la inhibición diferencial de la señalización de *EGFR* en células resistentes a gefitinib mediante inhibidores reversibles y irreversibles podría estar correlacionada con alteraciones en el tráfico de receptores, un modulador bien documentado de la señalización dependiente de *EGFR* (20). De hecho, el análisis del tráfico de *EGFR* en células resistentes derivadas de NCI-H1650 demostró un aumento constante de la

internalización de EGFR, en comparación con las células sensibles a fármaco originales, tal como se midió tanto mediante la internalización de EGF marcado con fluoresceína (figura 3C) como la cuantificación de EGFR biotinilado citoplásmico (figura 3D). No se observó ningún efecto de este tipo con el receptor de transferrina, lo que sugiere que esto no resultaba de una alteración generalizada en todo el procesamiento de receptores. Aunque se requiere trabajo adicional para definir el mecanismo preciso para esta alteración en el tráfico de EGFR, un proceso complejo en el que se han implicado numerosas proteínas reguladoras, estos resultados sugieren que la capacidad de gefitinib para inhibir la activación de EGFR está comprometida en estas células, mientras que la acción de los inhibidores irreversibles no está afectada de manera detectable.

Inhibición de la señalización de EGFR T790M y destrucción celular potenciada mediante inhibidores irreversibles. La supresión potenciada de la señalización de EGFR mediante inhibidores irreversibles de ERBB produjo la posibilidad de que estos fármacos también puedan mostrar actividad persistente en el contexto de células que albergan la mutación secundaria T790M en EGFR. Por tanto, se sometió a prueba el efecto de estos inhibidores sobre la línea celular de cáncer broncoalveolar NCI-H1975, que alberga tanto las mutaciones L858R como T790M en EGFR (18). Significativamente, esta línea celular se derivaba de un paciente que no se había tratado con un inhibidor de EGFR, lo que indica que esta mutación no está asociada únicamente con la resistencia a fármacos adquirida. Tanto HKI-357 como HKI-272 eran considerablemente más eficaces que gefitinib en la supresión de la autofosforilación de EGFR inducida por ligando y su señalización aguas abajo, tal como se determina mediante la fosforilación de AKT y MAPK (figura 4A). De manera similar, los tres inhibidores irreversibles suprimieron la proliferación en esta línea celular en condiciones en las que es resistente a gefitinib (figura 4B). Por tanto, los inhibidores irreversibles de ERBB parecen ser eficaces en las células que albergan el EGFR T790M así como en células con tráfico alterado del receptor de tipo natural.

Los resultados confirman el informe de las mutaciones T790M en EGFR como mutaciones secundarias que surgen en CPCNP previamente sensibles que albergan una mutación activante, asociada con la aparición de resistencia adquirida (17, 18). Sin embargo, esta mutación está presente sólo en un subconjunto de casos, e incluso tumores que albergan la mutación T790M pueden contener sólo una pequeña fracción de células con esta mutación. Estas observaciones implican que pueden coexistir múltiples mecanismos de resistencia en tumores recientes tras una respuesta inicial a gefitinib o inhibidores reversibles de EGFR similares. Además, estos hallazgos sugieren que los mecanismos de resistencia independientes de T790M pueden ser igualmente, si no más, eficaces que la propia sustitución T790M para conferir resistencia a fármacos y puedan explicar porqué tumores recurrentes raras veces muestran clonalidad para T790M (17, 18). Los mecanismos *in vitro* de resistencia a gefitinib adquirida no implican mutaciones de EGFR secundarias a una frecuencia significativa, pero en cambio se correlacionan con tráfico de receptores alterado. Sin embargo, debe observarse que no se examinó el tráfico de EGFR en todos los clones resistentes que se establecieron *in vitro*, y sigue siendo posible que mecanismos adicionales puedan contribuir a la resistencia a gefitinib en algunos de los clones. No obstante, prácticamente todos los clones resistentes a gefitinib mostraron sensibilidad comparable con los inhibidores irreversibles de ERBB.

Los resultados indican diferencias sorprendentes entre inhibidores competitivos de EGFR tales como gefitinib, cuya eficacia está limitada por el rápido desarrollo de resistencia a fármacos *in vitro*; e inhibidores irreversibles, para los que la resistencia adquirida parece ser rara (figura 2C). Se especula que el aumento de la internalización de EGFR unido a ligando en células resistentes pueden estar vinculado con la disociación del complejo gefitinib-EGFR al pH bajo de las vesículas intracelulares. Por el contrario, la reticulación irreversible del receptor no se vería afectada por tales alteraciones en el tráfico del receptor. La resistencia adquirida a gefitinib se mantiene de manera estable tras el pase de células durante hasta 20 generaciones en ausencia del fármaco, lo que sugiere que las alteraciones genéticas o epigenéticas en los genes que modulan el recambio de EGFR pueden subyacer a este fenómeno. Debido a que el tráfico del receptor no puede estudiarse fácilmente usando muestras clínicas disponibles, puede requerirse la identificación de tales alteraciones genómicas antes de que sean posibles las correlaciones clínicas. No obstante, un mecanismo de este tipo puede contribuir a la resistencia a gefitinib adquirida *in vivo* en pacientes con enfermedad recurrente que no tienen mutaciones secundarias en EGFR.

Los inhibidores irreversibles de ERBB también parecen ser eficaces en la superación de la resistencia a gefitinib mediada por la mutación T790M, un efecto que presumiblemente resulta de la conservación de la unión al inhibidor a pesar de la alteración de este residuo crítico. Mientras este trabajo estuvo en curso, se mostró que otro inhibidor irreversible de EGFR [CL-387.785, Calbiochem (27)] inhibía la actividad cinasa de los mutantes de EGFR T790M (17). Se propuso que la eficacia de CL-387.785 en el contexto de T790M resultaba de la ausencia de un cloruro en la posición 3 del grupo anilina, que está presente en gefitinib y se postuló que interfería de manera estérica con la unión a la metionina mutante en el codón 790. Sin embargo, EKB-569, HKI-272 y HKI-357 tienen todos restos cloruro en esa posición en el anillo de anilina, lo que sugiere que su capacidad compartida para unirse de manera irreversible a EGFR es probable que explique su eficacia, en vez de la ausencia de una interacción estérica específica con T790M (24-26). Por tanto, puede probarse que estos inhibidores irreversibles son ampliamente eficaces en sortear una variedad de mecanismos de resistencia, además de la mutación T790M.

Tabla 1: Presencia de la mutación T790M de EGFR a muy baja frecuencia en tumores recurrentes del caso 2

Tumor	N.º de clones	
	Mutante T790M	Tipo natural
Primario	0	75
Recurrente 1	2	48
Recurrente 2	1	55
Recurrente 3	0	55
Recurrente 4	0	59

La secuenciación de grandes números de productos de PCR clonados reveló que una minoría de alelos dentro de dos o cuatro lesiones de hígado contienen la mutación T790M.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, *et al.* Comparison of 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.

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

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

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; 60:13 83-13 87.

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.* ZD1839 (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 ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001;61:8887-8895.

15. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N. The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER-2 overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 2001;61:7184-7188.

16. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, *et al.* ZD1839, 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 ZD1839 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.

18. Baselga J, Rischin JB, Ranson M, *et al*. Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Onc* 2002;20:4292-4302.
19. Albanell J, Rojo F, Averbuch S, *et al*. Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J Clin Oncol*. 2001; 20:110-124.
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.
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.
35. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, *et al*. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342-4349.
36. Li B, Chang C, Yuan M, McKenna WG, Shu HG. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res* 2003; 63:7443-7450.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION WYETH

<120> MÉTODO PARA TRATAR CÁNCER RESISTENTE A GEFITINIB
<130> Documento 030258-57642-PCT
5 <140> Documento PCT/US06/003717
<141> 02-02-2006
<150> Documento 60/649.483
10 <151> 03-02-2005
<150> Documento 60/671.989
15 <151> 15-04-2005
<160> 5
<170> PatentIn Ver. 3.3
20 <210> 1
<211> 3878
25 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<220>
30 <221> CDS
<222> (246)..(3875)
35 <400> 1

ES 2 364 495 T3

```

ccccggcgcag cgcgggccgca gcagcctccg ccccccgcac ggtgtgagcg cccgacgcgg 60
ccgagggcggc eggagtcccc agctagcccc ggcggccgcc gccgccaga cgggacgaca 120
ggccacctcg tcggcgctccg cccgagtccc cgctcgcgg ccaacgccac aaccaccgcg 180
cacggcccccc tgactccgtc cagtattgat cgggagagcc ggagcgagct cttcggggag 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	ggc	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			
ggc	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	tcg	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		

ES 2 364 495 T3

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	
ggg 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	2498
Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr	
740 745 750	
tct ccg aaa gcc aac aag gaa atc ctc gat gaa gcc tac gtg atg gcc	2546
Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala	
755 760 765	
agc gtg gac aac ccc cac gtg tgc cgc ctg ctg ggc atc tgc ctc acc	2594
Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr	
770 775 780	
tcc acc gtg cag ctc atc acg cag ctc atg ccc ttc ggc tgc ctc ctg	2642
Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu	
785 790 795	
gac tat gtc cgg gaa cac aaa gac aat att ggc tcc cag tac ctg ctc	2690
Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu	
800 805 810 815	

aac tgg tgt gtg cag atc gca aag ggc atg aac tac ttg gag gac cgt 2738
Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg
820 825 830

cgc ttg gtg cac cgc gac ctg gca gcc agg aac gta ctg gtg aaa aca 2786
Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr
835 840 845

ccg cag cat gtc aag atc aca gat ttt ggg ctg gcc aaa ctg ctg ggt 2834
Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly
850 855 860

gcg gaa gag aaa gaa tac cat gca gaa gga ggc aaa gtg cct atc aag 2882
Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys
865 870 875

tgg atg gca ttg gaa tca att tta cac aga atc tat acc cac cag agt 2930
Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser
880 885 890 895

gat gtc tgg agc tac ggg gtg acc gtt tgg gag ttg atg acc ttt gga 2978
Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly
900 905 910

tcc aag cca tat gac gga atc cct gcc agc gag atc tcc tcc atc ctg 3026
Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu
915 920 925

gag aaa gga gaa cgc ctc cct cag cca ccc ata tgt acc atc gat gtc 3074
Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val
930 935 940

tac atg atc atg gtc aag tgc tgg atg ata gac gca gat agt cgc cca 3122
Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro
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

ES 2 364 495 T3

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

ES 2 364 495 T3

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

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 3

15

tgcarctcat cacgca 16

<210> 4

20

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

30

<400> 4

tgcarctcat caygca 16

<210> 5

<211> 16

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 5

15

tgcaactcat catgca 16

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor irreversible del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a gefitinib y/o erlotinib mediante un método, que comprende las etapas de:
 - a. monitorizar la evolución de un cáncer en un sujeto en un punto de tiempo tras haber iniciado el sujeto tratamiento con gefitinib y/o erlotinib, en el que la evolución del cáncer es indicativa de cáncer que es resistente al tratamiento con gefitinib y/o erlotinib; y
 - b. administrar la composición farmacéutica al sujeto que tiene un cáncer que es resistente al tratamiento con gefitinib y/o erlotinib.
2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor irreversible de EGFR se selecciona del grupo que consiste en EKB-569, HKI-272 y HKI-357.
3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor irreversible de EGFR se une a la cisteína 773 de EGFR.
4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la evolución del cáncer se monitoriza mediante inspección visual del cáncer.
5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en la que la inspección visual del cáncer es por medio de rayos X, tomografía computerizada o IRM.
6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la evolución del cáncer se monitoriza mediante detección de biomarcadores tumorales.
7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la monitorización de la evolución de un cáncer comprende comparar el cáncer en un segundo punto de tiempo con el cáncer en un primer punto de tiempo, en la que el segundo punto de tiempo está después del primer punto de tiempo, en la que el primer punto de tiempo es antes o después de la iniciación del tratamiento con gefitinib y/o erlotinib, en la que el aumento del crecimiento del cáncer indica evolución del cáncer.
8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que en puntos de tiempo adicionales se compara el cáncer con puntos de tiempo anteriores.
9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el cáncer es cáncer de células epiteliales.
10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el cáncer es cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer genito-urinario y cáncer de vejiga.
11. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a gefitinib y/o erlotinib, mediante un método que comprende las etapas de:
 - a. administrar gefitinib y/o erlotinib a un sujeto con cáncer;
 - b. monitorizar la evolución del cáncer del sujeto; y
 - c. administrar al sujeto el inhibidor irreversible de EGFR tras la indicación de evolución del cáncer.
12. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 11, seleccionándose el inhibidor irreversible de EGFR del grupo que consiste en EKB-569, HKI-272 y HKI-357.
13. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 11, uniéndose el inhibidor irreversible de EGFR a la cisteína 773 de EGFR.
14. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 11, en el que la evolución del cáncer se monitoriza mediante inspección visual del cáncer.
15. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 14, en el que la inspección visual del cáncer es por medio de rayos X, tomografía computerizada o IRM.

16. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 11, en el que la evolución del cáncer se monitoriza mediante detección de biomarcadores tumorales.
- 5 17. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 11, en el que la monitorización de la evolución de un cáncer comprende comparar el cáncer en un segundo punto de tiempo con el cáncer en un primer punto de tiempo, en el que el segundo punto de tiempo es después del primer punto de tiempo, en el que el primer punto de tiempo es antes o después de la iniciación del tratamiento con gefitinib y/o erlotinib, en el que el aumento del crecimiento del cáncer indica evolución del cáncer.
- 10 18. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 17, en el que se compara el cáncer en puntos de tiempo adicionales con puntos de tiempo anteriores.
- 15 19. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 11, en el que el cáncer es cáncer de células epiteliales.
- 20 20. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 11, en el que el cáncer es cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer genito-urinario y cáncer de vejiga.
- 25 21. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 11, administrándose el inhibidor irreversible de EGFR simultáneamente con un inhibidor reversible de EGFR.
- 30 22. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 21, siendo el inhibidor reversible de EGFR gefitinib o erlotinib.
- 35 23. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto con un cáncer que tiene una mutación en EGFR (SEQ ID NO: 1), en la que la mutación es la sustitución de una treonina por una metionina en la posición 790; y comprendiendo la composición farmacéutica un inhibidor irreversible de EGFR.
- 40 24. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 23, en la que el inhibidor de EGFR se selecciona del grupo que consiste en EKB-569, HKI-272 y HKI-357.
- 45 25. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 23, en la que el inhibidor irreversible de EGFR se une a la cisteína 773.
- 50 26. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 23, en la que el cáncer es cáncer de células epiteliales.
27. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 23, en la que el cáncer es cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer genito-urinario y cáncer de vejiga.
28. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2 ó 24, en la que el inhibidor de EGFR comprende HKI-272.
29. Inhibidor irreversible de EGFR para su uso según la reivindicación 12, comprendiendo el inhibidor irreversible de EGFR HKI-272.

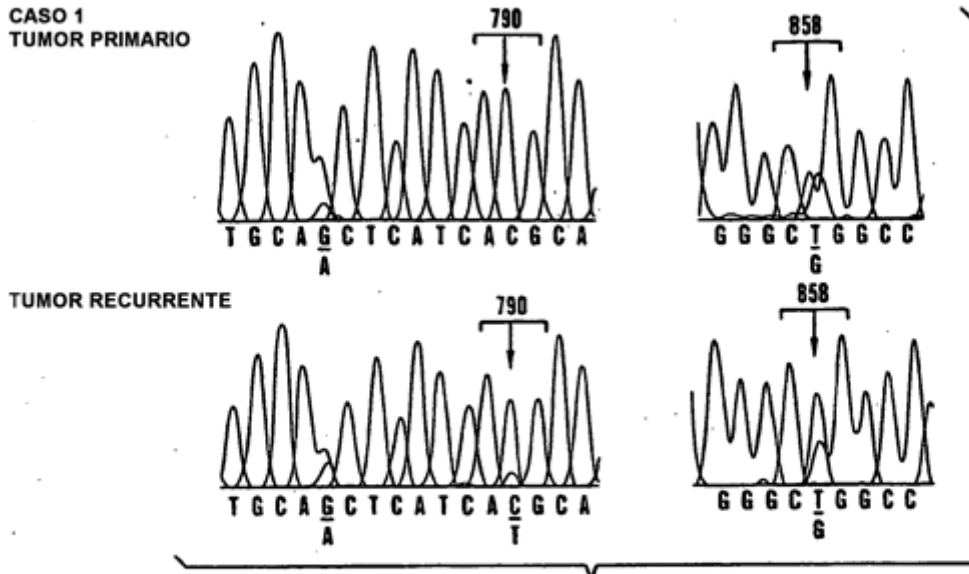


FIG. 1A

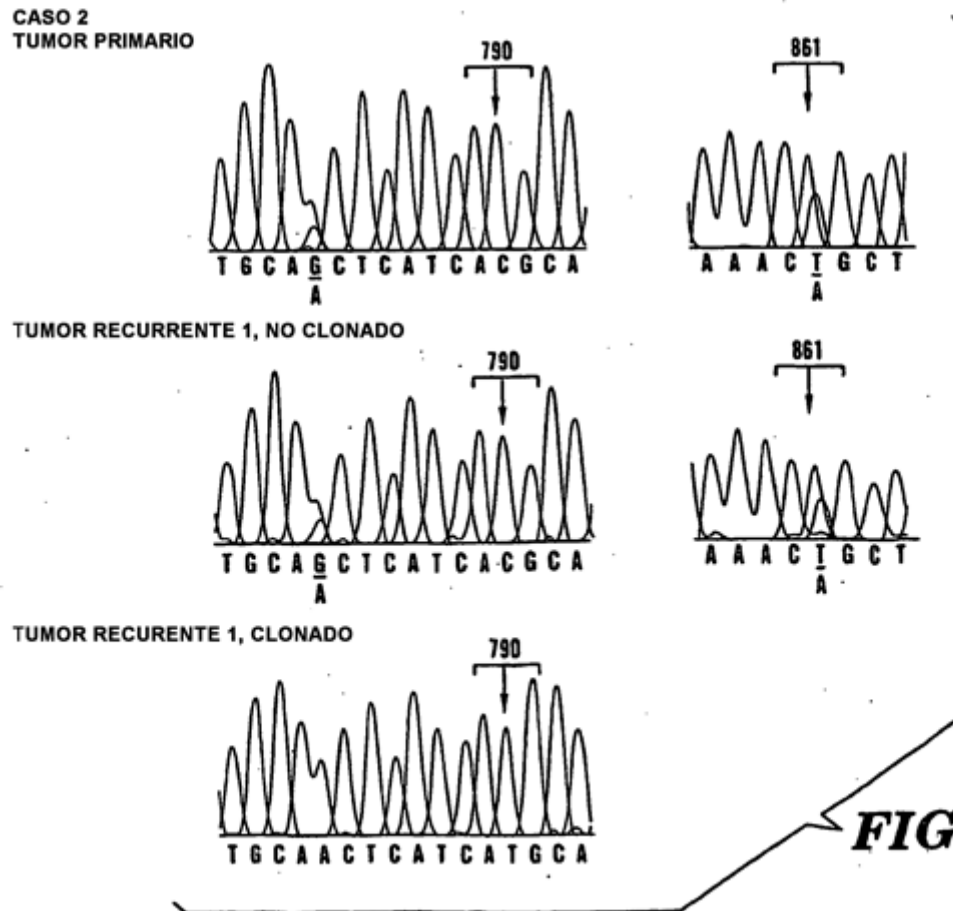


FIG. 1B

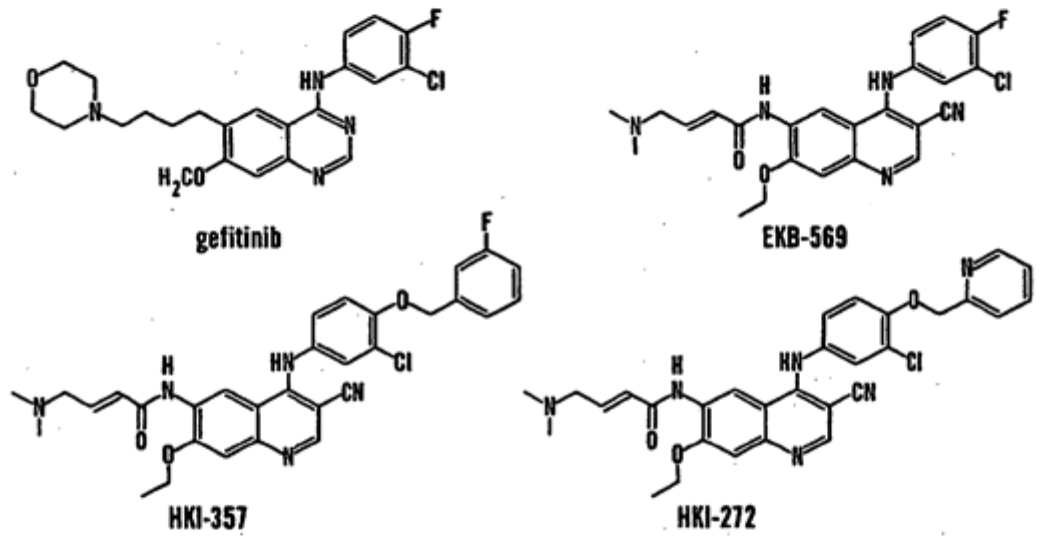
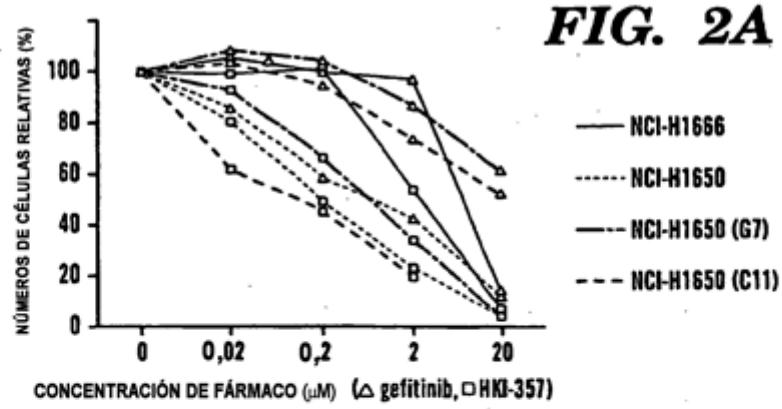


FIG. 2B

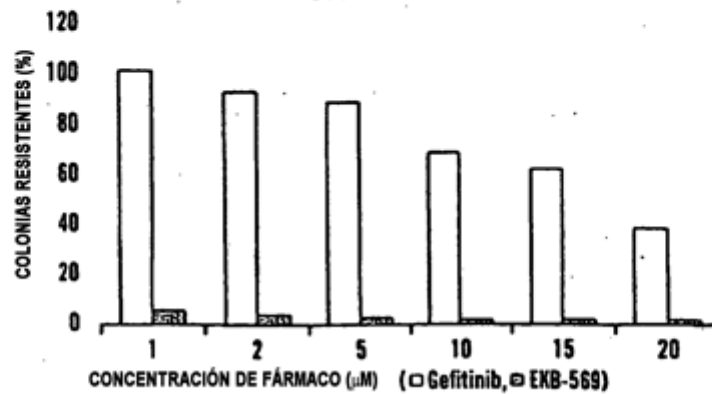


FIG. 2C

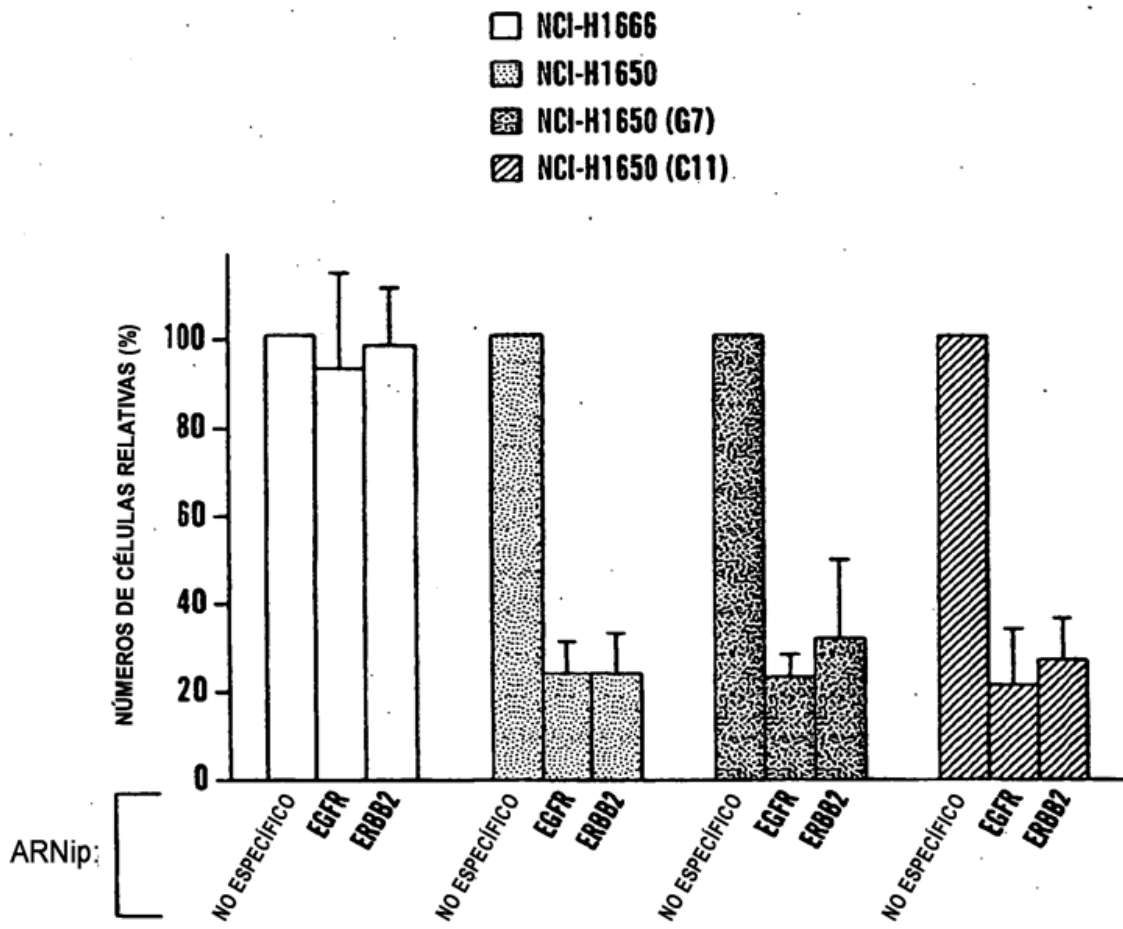


FIG. 3A

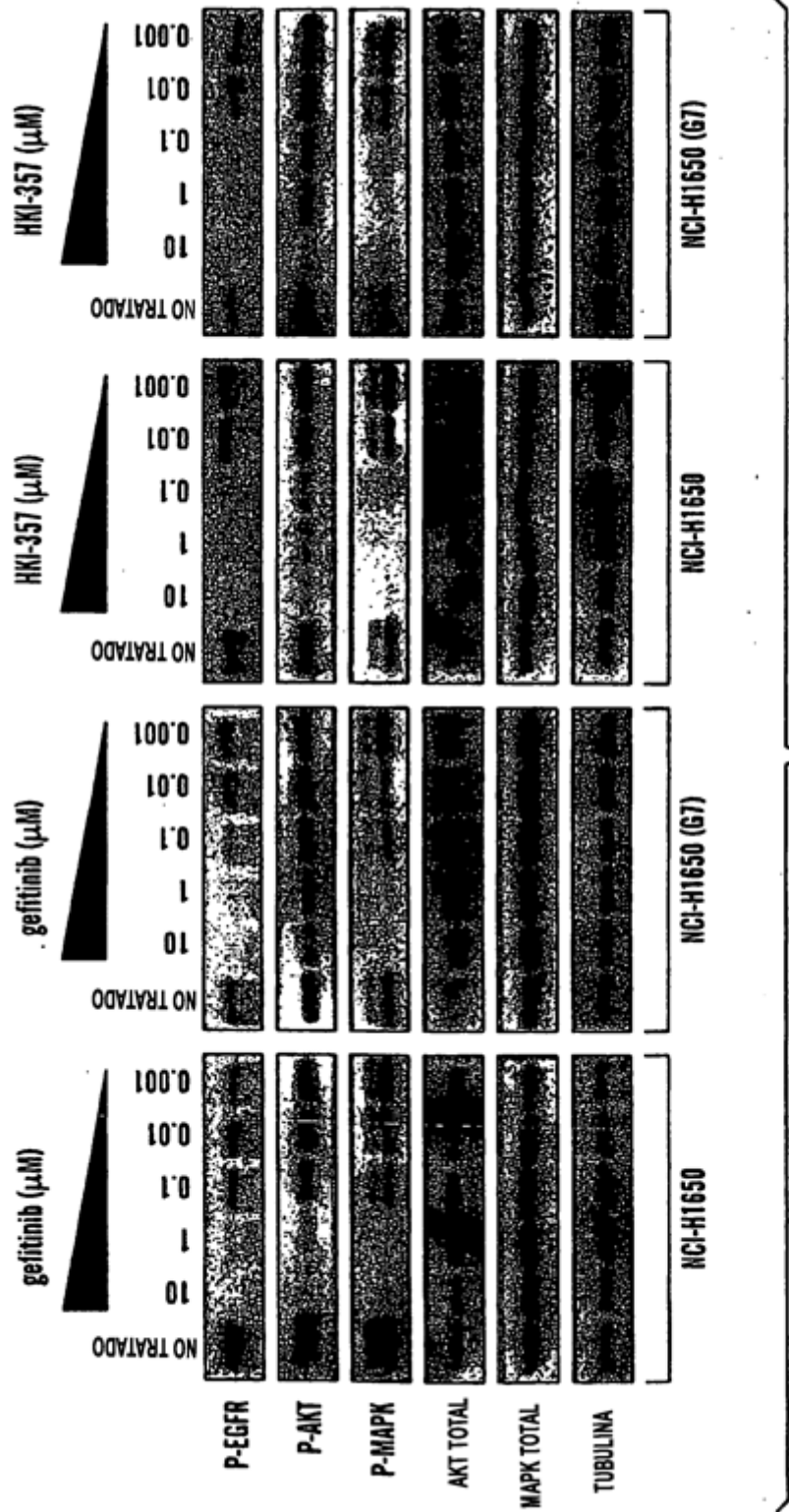


FIG. 3B

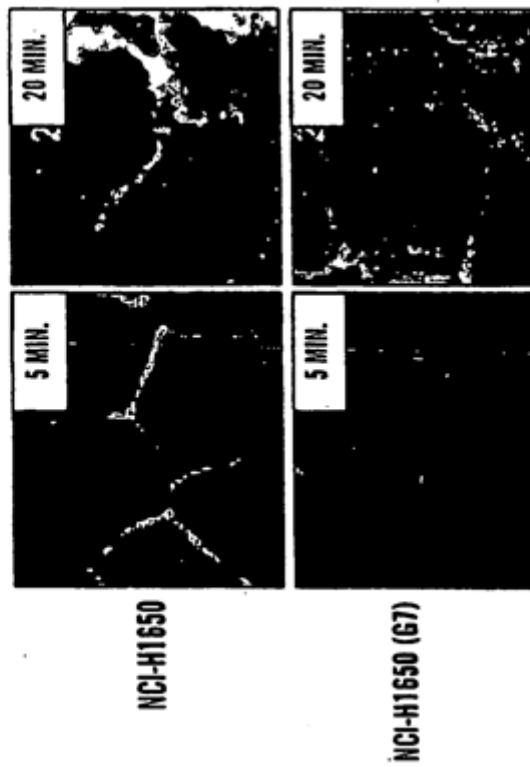


FIG. 3C

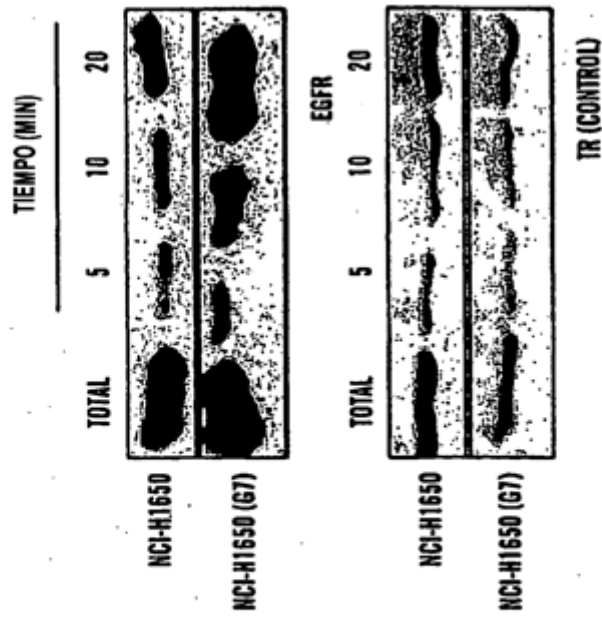


FIG. 3D

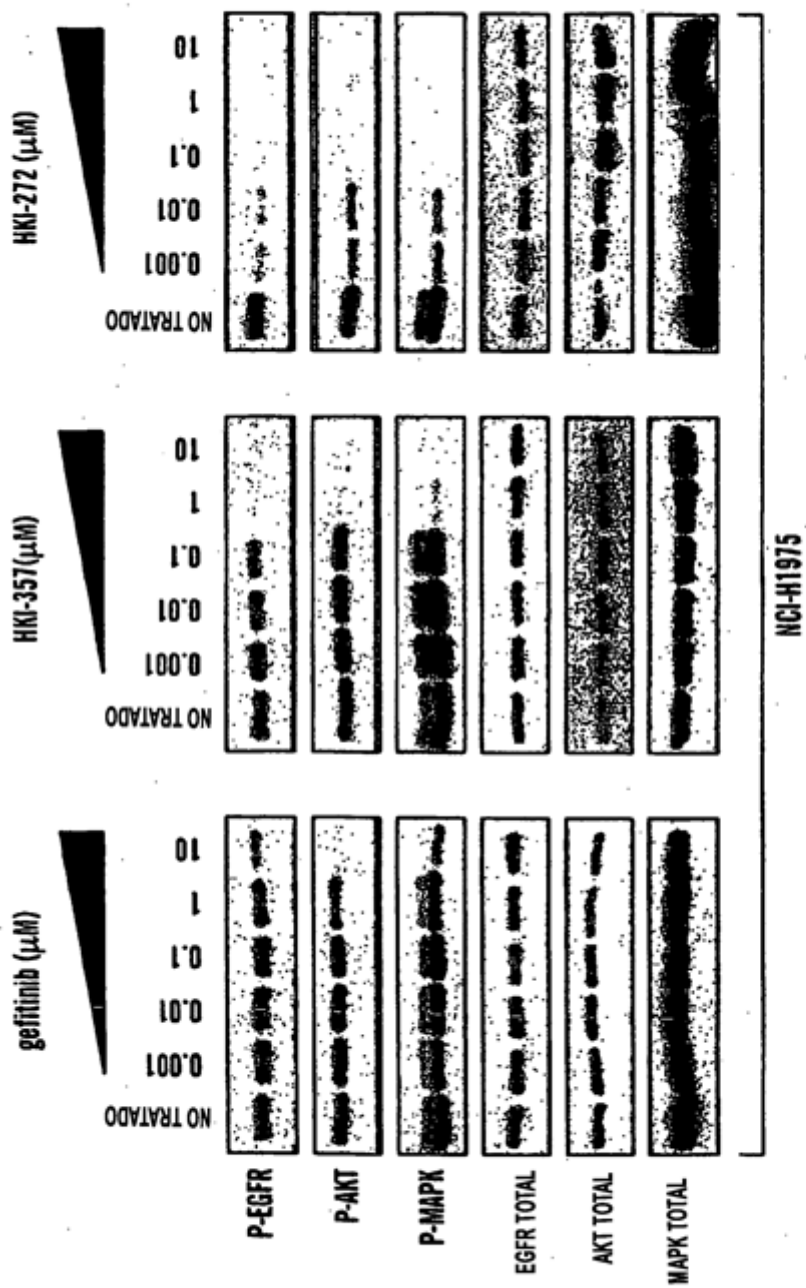


FIG. 4A

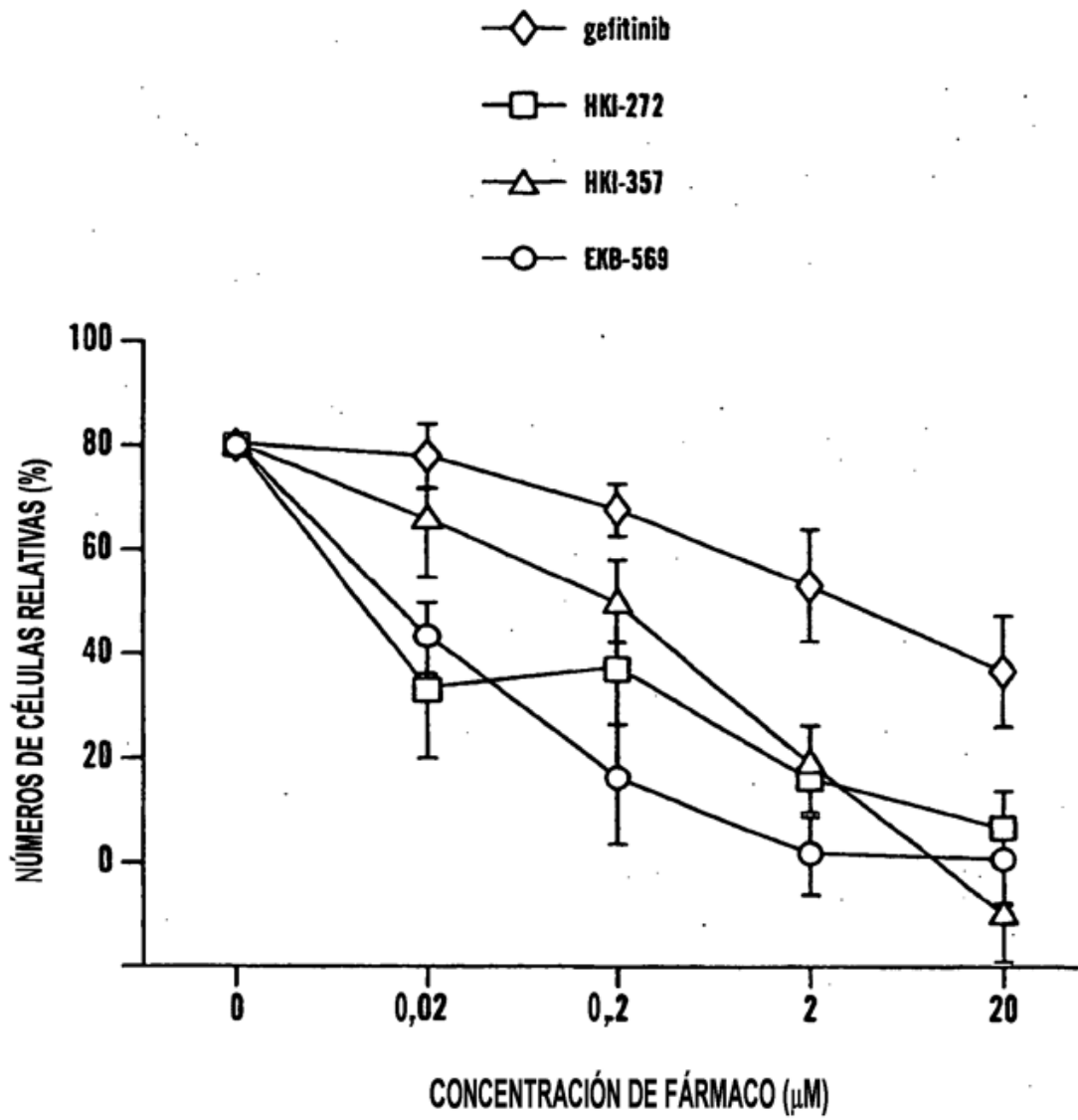


FIG. 4B

CCCGGCGCAGCGCGGCCCGCAGCAGCCTCCGCCCGCCGACGGTGTGAGCGCCCGACGCGG -185

 CCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAGCTAGCCCCGGCGGCCGCCGCCAGACCGGACGACA -125

 GGCCACCTCGTCGGCGTCCGCCCGAGTCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGCG -65

 CACGGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCTCTTCGGGGAG -5

 CAGCGATGCGACCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCT 55
-M--R--P--S--G--T--A--G--A--A--L--L--A--L--L--A--A--L-- 18
 GCCCGGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCA 115
 C--P--A--S--R--A--L--E--E--K--K--V--C--Q--G--T--S--N--K--L-- 38
 CGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCATTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTG 175
 T--Q--L--G--T--F--E--D--H--F--L--S--L--Q--R--M--F--N--N--C-- 58
 AGGTGGTCCTTGGGAATTTGGAAATPACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCT 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
 TTCCTTTGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCTATGCCT 355
 I--P--L--E--N--L--Q--I--I--R--G--N--M--Y--Y--E--N--S--Y--A-- 118
 TAGCAGTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAACCGGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAA 415
 L--A--V--L--S--N--Y--D--A--N--K--T--G--L--K--E--L--P--M--R-- 138
 ATTTACAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTTCAGCAACAACCCTGCCCTGTGCAACG 475
 N--L--Q--E--I--L--H--G--A--V--R--F--S--N--N--P--A--L--C--N-- 158
 TGGAGAGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCAGCAACATGTGCGATGG 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
 GCTGGGGTGCAGGAGAGGAGAAGTGCAGAAACTGACCAAAATCATCTGTGCCCAGCAGT 655
 C--W--G--A--G--E--E--N--C--Q--K--L--T--K--I--I--C--A--Q--Q-- 218
 GCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCAGTGAAGTGTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCAG 715
 C--S--G--R--C--R--G--K--S--P--S--D--C--C--H--N--Q--C--A--A-- 238
 GCTGCACAGGCCCGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCAGAGACGAAGCCA 775
 G--C--T--G--P--R--E--S--D--C--L--V--C--R--K--F--R--D--E--A-- 258
 CGTGCAAGGACACCTGCCCGCCACTCATGCTCTACAACCCACCACGTACCAGATGGATG 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

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
AGGAAGACGGCGTCCGCAAGTGTAAAGAAGTGCGAAGGGCCTTGCCGCAAAGTGTGTAACG	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
AGGAAATCACAGGGTTTTTGTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATG	1255
K--E--I--T--G--F--L--L--I--Q--A--W--P--E--N--R--T--D--L--H--	418
CCTTTGAGAACCCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTG	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
GAGATGTGATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAAATACAATAAACTGGAAAA	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
AGCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGT	1615
E--P--R--D--C--V--S--C--R--N--V--S--R--G--R--E--C--V--D--K--	538
GCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCC	1675
C--N--L--L--E--G--E--P--R--E--F--V--E--N--S--E--C--I--Q--C--	558
ACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAAC	1735
H--P--E--C--L--P--Q--A--M--N--I--T--C--T--G--R--G--P--D--N--	578
GSTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCAGGAG	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
TGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACCTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGA	1915
L--C--H--P--N--C--T--Y--G--C--T--G--P--G--L--E--G--C--P--T--	638
ATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTGTGCTGCTGG	1975
N--G--P--K--I--P--S--I--A--T--G--M--V--G--A--L--L--L--L--L--	658
TGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTTCCGGAAGCGCACGC	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.)

TGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTC 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

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

AAATTCCCCTGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAA 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

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

CCAAAGTGCCTGGGTGCGGAAGAGAAAAGAAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATCA 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

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--I--L--E--K--G--E--R--L--P--Q--P--P--I-- 938

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

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

TTGTCATTCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCTACAGACTCCAAGTCTTACC 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

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

GTGCAACCAGCAACAATTCCACCGTGGCTTGCAATTGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGTC 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

 AGGACAGCATAGACGACACCTTCCTCCCAGTGCCTGAATACATAAACCCAGTCCGTCCCA 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

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

 TCAAACTGTCCAGCCACCTGTGTCAACAGCACATTCGACAGCCCTGCCCACTGGGCCC 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.)

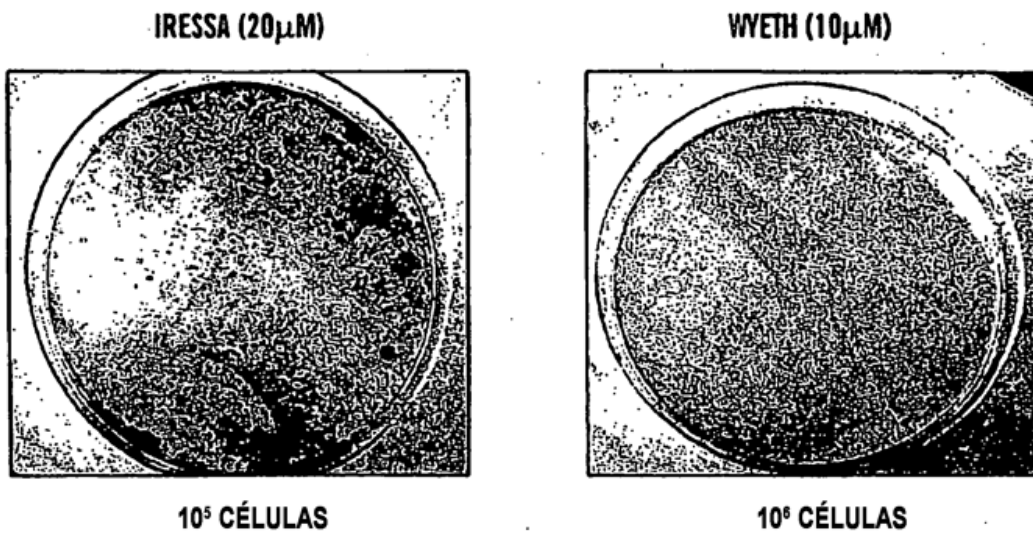


FIG. 6