

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 709**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2006** **E 06773201 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012** **EP 1913157**

54 Título: **Mutaciones en EGFR y KRAS para predecir la respuesta de un paciente al tratamiento con inhibidores de EGFR**

30 Prioridad:

28.06.2005 US 695174 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2013

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 , US

72 Inventor/es:

HILLAN, KENNETH, J.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 709 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

Mutaciones en EGFR y KRAS para predecir la respuesta de un paciente al tratamiento con inhibidores de EGFR.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al diagnóstico y al tratamiento del cáncer y, en particular, a la detección de mutaciones de diagnóstico y/o pronóstico.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento de tirosina-cinasa del tipo 1, que desempeñan papeles críticos en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celulares. Típicamente, la activación de estos receptores tiene lugar por medio de una unión a ligandos específicos, lo que resulta en una hetero u homodimerización entre miembros de la familia de receptores, con la subsiguiente autofosforilación del dominio de tirosina-cinasa. Esta activación desencadena una cascada de rutas de señalización intracelular implicadas en la proliferación celular (la ruta de la cinasa de ras/raf/MAP) y en la supervivencia (la ruta de la cinasa de PI3/Akt). A algunos miembros de esta familia, incluidos EGFR y HER2, se les atribuye una participación directa en la transformación celular.

[0003] Algunos tumores malignos están asociados con una expresión aberrante o excesiva de EGFR y/o una expresión excesiva de sus ligandos específicos, p. ej., el factor de crecimiento transformante α (Gullick, Br Med Bull 1991, 47: 87 – 98; Modjtahedi y Dean, Int J Oncol 1994, 4: 277 – 96; Salomon y col., Crit Rev Oncol Hematol 1995, 19: 183 – 232). La expresión excesiva de EGFR se ha asociado con un pronóstico adverso en algunos cánceres humanos, incluido NSCLC. En algunos casos, la expresión excesiva de EGFR en tumores se ha correlacionado a la vez con quimiorresistencia y un mal pronóstico (Lei y col., Anticancer Res 1999, 19: 221 – 8; Veale y col., Br J Cancer 1993, 68: 162 – 5). Estas observaciones sugieren que los agentes que inhiben eficazmente la activación del receptor EGFR y la subsiguiente señalización posterior pueden tener actividad clínica en diversos cánceres humanos, incluido NSCLC.

[0004] TarcevaTM (también conocida como erlotinib; OSI-774), una quinazolina, es un potente inhibidor selectivo de la tirosina-cinasa de EGFR, activo por vía oral. Erlotinib inhibe la tirosina-cinasa del EGFR humano con una CI_{50} de 2 nM (0,786 mg/ml) en un ensayo enzimático *in vitro*. Esta inhibición es selectiva para la tirosina-cinasa de EGFR, resulta en una parada del ciclo celular en la fase G_1 y es reversible. La administración de erlotinib por vía oral a ratones ha demostrado una reducción superior al 70 % de la autofosforilación de EGFR en xenoinjertos humanos y se ha demostrado una notable inhibición del crecimiento de los xenoinjertos HN5 y A431 en ratones sin pelo. Además de su actividad como agente único en sistemas de ensayo *in vivo*, erlotinib se ha evaluado en combinación con varios agentes quimioterapéuticos para determinar posibles interacciones. Una interacción aditiva se ha observado entre erlotinib y paclitaxel, cisplatino, gemcitabina y doxorubicina.

[0005] El cáncer de pulmón es la causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer, tanto para hombres como mujeres en los Estados Unidos. En el año 2000 se estimó que se diagnosticarían 164.000 nuevos casos y que 157.000 pacientes morirían a causa de esta enfermedad (Greenlee y col., CA Cancer J Clin 2001, 51: 15 – 36). Aproximadamente el 75 % de estos pacientes habrían tenido histologías no microcíticas y la mayoría se presentaría con los estadios inoperables IIIB o IV de la enfermedad. Para aquellos pacientes con una enfermedad más limitada en el momento de la presentación (estadios I – IIIA), es común una recaída después de un tratamiento quirúrgico estándar con o sin quimio y/o radioterapia adyuvante o neoadyuvante. Estos resultados dan lugar a una supervivencia general en cinco años en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) de aproximadamente el 12 % y sirven para resaltar las necesidades médicas aún no satisfechas en esta enfermedad.

[0006] El compuesto de platino cisplatino fue el primer agente quimioterapéutico en mostrar un beneficio clínico en el tratamiento del NSCLC avanzado localmente o metastásico. Ensayos clínicos aleatorizados demostraron una mejora en las tasas de respuesta, en la calidad de vida y en la supervivencia, en comparación con el mejor tratamiento de apoyo (Rapp y col. 1988). Sin embargo, la magnitud de esta mejora fue moderada, medida en semanas. Por consiguiente, se han evaluado varios agentes quimioterapéuticos nuevos como agentes únicos y en combinación con las sales de platino para el tratamiento de primera línea. La conclusión de estos estudios es que la moderna quimioterapia de “doble” parece alcanzar tasas de respuesta del 15 – 20 %, una mediana del tiempo hasta la progresión de la enfermedad de 3 – 4 meses y una mediana de la supervivencia de 7 – 8 meses. Las mejoras moderadas de la eficacia con tratamientos combinados con respecto a los resultados obtenidos con cisplatino han establecido estos tratamientos como tratamientos de referencia para los pacientes con NSCLC avanzado y un estado general aceptable (Non-Small Cell Lung Cancer Cooperative Group, Br Med J 1995, 311: 899 – 909; American Society of Clinical Oncology, J Clin Oncol 1997, 15: 2996 – 3018; Breathnach y col., J Clin Oncol 2001, 19: 1734 – 42).

[0007] Pao W., y col. (KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. PLOS MEDICINE. vol. 2, n°. 1, enero de 2005 (2005 – 01), página e17) desvelan que mutaciones en KRAS

están asociadas con una falta de sensibilidad a gefinitib o erlotinib, mientras que mutaciones en EGFR están asociadas con sensibilidad a dichas moléculas y proponen mejorar las decisiones sobre el tratamiento mediante la determinación del estado mutacional de ambos, EGFR y KRAS.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La invención proporciona un procedimiento para la identificación de un paciente que no es sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR en combinación con un agente quimioterapéutico y un procedimiento para determinar si un tumor responderá al tratamiento con un inhibidor de EGFR en combinación con un agente quimioterapéutico, ambos según se definen en las reivindicaciones.

[0009] La invención proporciona también un inhibidor de EGFR para uso en un procedimiento para el tratamiento de un tumor, también según se define en las reivindicaciones.

[0010] En este documento se desvela un procedimiento para la identificación de un tumor sensible al tratamiento en un sujeto humano que comprende la determinación de la presencia de un gen EGFR mutado o una proteína EGFR mutada en una muestra de dicho tumor, en que dicha mutación se localiza en los exones 18 – 21 de EGFR, según lo cual, la presencia de un gen EGFR mutado o una proteína EGFR mutada indican que el tumor es sensible al tratamiento.

[0011] En este documento se desvela un procedimiento para el tratamiento de un tumor en un mamífero que comprende la identificación de la presencia de una mutación en EGFR en dicho tumor y el tratamiento de dicho mamífero con un agente contra el cáncer.

[0012] En este documento se desvela un procedimiento para la identificación de una mutación en EGFR en una muestra que comprende la puesta en contacto de un ácido nucleico de dicha muestra con una sonda que es capaz de hibridar específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada o un fragmento de este que incorpora una mutación y la detección de la hibridación.

[0013] En este documento se desvelan sondas de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada o un fragmento de este que incorpora una mutación.

[0014] En este documento se desvela un procedimiento para la detección de un gen EGFR mutado en una muestra que comprende la amplificación del ácido nucleico de dicha muestra correspondiente al dominio de cinasa de dicho gen EGFR o a un fragmento de este del que se sospecha que contiene una mutación y la comparación de la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del correspondiente gen EGFR natural o fragmento de este.

[0015] En este documento se desvela un procedimiento para la identificación en un sujeto humano de un tumor sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR que comprende (i) la determinación de la presencia de una proteína o un gen KRAS naturales en una muestra de dicho tumor, según lo cual, la presencia de una proteína o un gen KRAS naturales indica que el tumor es sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR o (ii) la determinación de la presencia de una proteína o un gen KRAS mutados en una muestra de dicho tumor, según lo cual, la ausencia de una proteína o un gen KRAS mutados indica que el tumor es sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016]

La figura 1 ilustra la secuencia aminoacídica de EGFR1 natural (SEQ ID NO: 1), en la que la secuencia señal son los restos 1 – 24, el dominio extracelular incluye los restos 24 – 645, el dominio transmembrana incluye los restos 646 – 668 y el dominio citoplásmico incluye los restos 669 – 1210. La región del dominio de tirosina-cinasa son los restos 718 – 964 y el sitio de fosforilación de treonina es el resto 678.

Las figuras 2a a 2d contienen la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 2) de EGFR natural, en la que el exón 18 corresponde a los nucleótidos 2308 – 2430, el exón 19 corresponde a los nucleótidos 2431 – 2529, el exón 20 corresponde a los nucleótidos 2530 – 2715 y el exón 21 corresponde a 2716 – 2871.

La figura 3 es una representación gráfica de las regiones extracelular (arriba) e intracelular (abajo) de EGFR.

La figura 4 es una curva de Kaplan-Meier que muestra el tiempo hasta la progresión en pacientes con tumores de NSCLC que expresan EGFR natural (línea continua) y EGFR mutante (línea discontinua).

La figura 5 es una curva de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de pacientes con tumores de NSCLC que expresan EGFR natural (línea continua) y EGFR mutante (línea discontinua).

La figura 6 es una autorradiografía que ilustra la inhibición de la autofosforilación de EGFR natural y EGFR mutante (L858R y de1746 – 752) con concentraciones variables de erlotinib en células COS7 transfectadas de manera transitoria.

- 5 La figura 7 es una gráfica que muestra la inhibición de la autofosforilación de EGFR natural y EGFR mutante (L858R y del 1746 – 752) con concentraciones variables de erlotinib en células COS7 transfectadas de manera transitoria.

La figura 8 ilustra mutaciones en los exones 18 y 19 del gen EGFR y en las secuencias de proteína. Los cambios de aminoácidos y nucleótidos, así como las inserciones se indican en letra negrita subrayada, mientras que las

- 10 deleciones se muestran como guiones (–).

La figura 9 ilustra mutaciones en los exones 20 y 21 del gen EGFR y en las secuencias de proteína. Los cambios de aminoácidos y nucleótidos, así como las inserciones se indican en letra negrita subrayada, mientras que las deleciones se muestran como guiones (–).

- 15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0017] Es un descubrimiento de la presente descripción que en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tienen lugar mutaciones asociadas con la tumorigénesis. Aunque se sabía previamente que una actividad aberrante de EGFR estaba asociada con diversos cánceres, era desconocido que existían mutaciones en el dominio de cinasa de EGFR (KDR) causantes de una actividad de señalización aberrante asociada con algunos cánceres. Sorprendentemente, los pacientes que padecen tumores con mutaciones en el KDR de EGFR tienen un mejor pronóstico que aquellos con el EGFR natural. Las mutaciones en el KDR del gen EGFR pueden implicar reorganizaciones como inserciones y deleciones, así como mutaciones puntuales.

- 25

[0018] Las muestras de aproximadamente 250 pacientes participantes en un estudio clínico de fase III, con doble enmascaramiento y aleatorizado, denominado Tribute, se secuenciaron para identificar mutaciones en los exones 18 – 21 de EGFR. El estudio Tribute, que incluyó 1.079 pacientes en aproximadamente 150 centros en los Estados Unidos con NSCLC confirmada histológicamente que no habían recibido quimioterapia anteriormente, comparó el tratamiento con erlotinib + quimioterapia (carboplatino/paclitaxel) con solamente quimioterapia. Los pacientes recibieron paclitaxel (200 mg/m², en 3 horas por infusión i.v.) seguido de carboplatino (ABC = 6 mg/ml x minuto por infusión durante 15 – 30 minutos según la fórmula de Calvert) con o sin erlotinib (100 mg/día por vía oral, aumentados a 150 mg/día para pacientes tolerantes). Las muestras de tumores de aproximadamente 250 pacientes, bloques o preparaciones sobre portaobjetos sin teñir incluidos en parafina y fijados con formalina, recogidas en el estudio Tribute se enriquecieron en células tumorales mediante microdissección por captura con láser y a continuación se extrajo el ADN. Los exones 18 – 21 se amplificaron por PCR anidada y las secuencias bidireccionales de cada producto de PCR se obtuvieron utilizando terminadores fluorescentes. Las mutaciones descubiertas en la secuenciación se muestran en la tabla 1:

- 35

(Tabla 1 en página siguiente)

Tabla 1

Mutación en la proteína	Mutación en el ácido nucleico	
G719A	2402G > C	18
G719C	2401G > T	18
G719S	2401G > A	18
E746-R748 del	2482 – 2490 del GGAATTAAGA (SEQ ID NO: 32)	19
E746-A750 del	2481 – 2495 del GGAATTAAGAGAAGC (SEQ ID NO: 33)	19
E746-R748 del E749Q A750P	2482 – 2490 del GAATTAAGA 2491G > C 2494G > C	19
L747-E749 del A750P	2485 – 2493 del TTAAGAGAA 494G > C	19
L747S R748-P753 del	2486 – 2503 del TAAGAGAAGCAACATCTC (SEQ ID NO: 34)	19
L747-S752 del E746V	2485 – 2502 del TTAAGAGAAGCAACATCT 2483A > T (SEQ ID NO: 35)	19
L747-T751 del ins S	2486 – 2494 del TAAGAGAAGCAA (SEQ ID NO: 36)	19
S752-I759 del	2499 – 2522 del ATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAAT (SEQ ID NO: 37)	19
M766-A767 AI ins	2544 – 2545 ins GCCATA	20
S768-V769 SVA ins	2554 – 2555 ins CCAGCGTGG (2556C > T silenciosa)	20
L858R	2819T > G	21
G719C	2401G > T	18
S768I	2549G > T {2607G > A SNP silencioso}	20
G719C	2401G > T	18
V765M	2539G > A	20
S768I	2549G > T	20
A755V	2510C > T	19
L747S	2486T > C	19
E746K	2482G > A	19
P772-H773 V ins	2561 – 2562 ins GGT	20
L858P	2819T > C	21
L861Q	2576T > A	21
P772-H773 NS ins H773Y	2562 – 2563 ins AACTCC 2563C > T	20
T790M	2615C > T	20
L858R	2819T > G	21
S784F		21
L858R		21

ins = inserción, del = delección

- 5 **[0019]** La numeración de los nucleótidos para las mutaciones se basa en la secuencia de referencia de las figuras 2a – 2d.

- [0020]** El resultado clínico de los pacientes con tumores con mutaciones en EGFR y con EGFR natural se analizó de acuerdo con la respuesta (completa + parcial), el beneficio (respuesta + enfermedad estable) y la progresión de la enfermedad. Las lesiones se evaluaron mediante los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST), en los que “respuesta completa” (RC) se define como la desaparición de todas las lesiones diana; “respuesta parcial” (RP) se define como una disminución de al menos el 30 % en la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana, tomando como referencia la suma inicial de los diámetros mayores; “progresión de la enfermedad” (PE) se define como un aumento de al menos el 20 % en la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana, tomando como referencia la menor suma de los diámetros mayores registrada desde el inicio del tratamiento o la aparición de una o más lesiones nuevas; y “enfermedad estable” (EE) se define como ni una disminución suficiente para considerarse como respuesta parcial ni un aumento suficiente para considerarse como progresión de la enfermedad, tomando como referencia la menor suma de los diámetros mayores desde el inicio del tratamiento.

20

- [0021]** Los resultados del análisis se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

	EGFR mutante n = 24	EGFR natural n = 181
Tasa de respuesta/beneficio		
Respuesta (RC + RP)	11 46 %	46 25 %

Beneficio (RC + RP + EE)	18	75 %	105	58 %
EE	7	29 %	59	33 %
PE	6	25 %	76	42 %
Supervivencia (días)				
Mediana	435		309	
Intervalo	133 – 687		9 – 643	
RC = respuesta completa; RP = respuesta parcial; EE = enfermedad estable; PE = progresión de la enfermedad				

[0022] El análisis del resultado clínico reveló que los pacientes con tumores que expresan una mutación en los exones 18 – 21 de EGFR tienen mejor pronóstico que aquellos con tumores que expresan EGFR natural. Los pacientes con EGFR mutante mostraron mayor tasa de respuesta, mayor tasa de beneficio y mayor supervivencia al ser tratados con quimioterapia o con quimioterapia más erlotinib. Estos resultados son útiles para predecir el resultado, de modo que los pacientes cuyos tumores presentan mutaciones en alguno de los exones 18 – 21 de EGFR o en todos ellos tienen un pronóstico más favorable que los pacientes cuyos tumores no presentan tales mutaciones.

[0023] Por consiguiente, la presente descripción proporciona un procedimiento para la determinación del pronóstico de un paciente con un tumor que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una o más mutaciones en los exones 18 – 21 de EGFR (o en la secuencia aminoacídica correspondiente a los exones 18 – 21) en una muestra de dicho tumor, según lo cual, la presencia de dichas una o más mutaciones en EGFR indica un mejor pronóstico en comparación con la ausencia de dichas una o más mutaciones en EGFR. Con “pronóstico” se indica respuesta y/o beneficio y/o supervivencia. Con “mutaciones en EGFR” se indican una secuencia aminoacídica o de ácido nucleico que difiere de la proteína o el ácido nucleico de EGFR natural, respectivamente, encontrada en un alelo (heterocigoto) o en ambos alelos (homocigoto) y que pueden ser somáticas o de la línea germinal. En una realización concreta, dicha mutación se encuentra en la región del dominio de cinasa (KDR) de EGFR. En otra realización concreta, la mutación es una sustitución, una delección o una inserción de aminoácidos, según se muestra en la tabla 1. En una realización, la mutación aminoacídica es una o más de las siguientes: G719A, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 Al ins y S768-V769 SVA ins. En otra realización concreta, la mutación es una mutación puntual, una delección o una inserción en el ácido nucleico según se muestra en la tabla 1. En una realización, la mutación en el ácido nucleico es una o más de las siguientes: 2402G > C; 2482G > A; 2486T > C; 2491G > C; 2494G > C; 2510C > T; 2549G > T; 2819T > C; 2482 – 2490 del; 2486 – 2503 del; 2544 – 2545 ins GCCATA; y 2554 – 2555 ins CCAGCGTGG.

[0024] Los exones 18 – 21 del EGFR de la línea celular tumoral H1975, que mostraba resistencia al tratamiento con erlotinib, se secuenciaron y se encontró que incorporaban una mutación T790M en combinación con una mutación L858R. Por consiguiente, la presente descripción proporciona además un procedimiento para determinar el pronóstico de un paciente con un tumor que comprende la determinación de la presencia o ausencia de la mutación T790M en EGFR en una muestra de dicho tumor, según lo cual, la presencia de dicha mutación T790M en EGFR indica un peor pronóstico en comparación con la ausencia de dicha mutación T790M en EGFR. Además, se proporciona un procedimiento para la identificación de pacientes con un tumor menos sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR como erlotinib o gefitinib, ya sea en combinación con quimioterapia o no, que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una mutación T790M en EGFR en el tumor del paciente, según lo cual, la presencia de dicha mutación indica que el paciente responderá menos a dicho tratamiento en comparación con un paciente con un tumor que no tiene dicha mutación T790M en EGFR. Además, se proporciona un procedimiento para la identificación de un tumor resistente al tratamiento con un inhibidor de EGFR, como un inhibidor de la unión al dominio de cinasa (por ejemplo, erlotinib o gefitinib), ya sea en combinación con quimioterapia o no, que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una mutación T790M en EGFR en una muestra del tumor, según lo cual, la presencia de dicha mutación indica que el tumor es resistente a dicho tratamiento. Se entiende que la determinación de la mutación se realiza en la proteína o en un ácido nucleico (ADN genómico o ARNm) y se lleva a cabo mediante técnicas como las que se describen en este documento. En una realización concreta, dicho inhibidor de EGFR compete con ATP en el dominio de cinasa de EGFR. En una realización concreta el inhibidor de EGFR es erlotinib.

[0025] También se desvela un procedimiento para el tratamiento de un paciente con un tumor que incorpora una proteína o gen EGFR con la mutación T790M (o el tratamiento de un tumor que incorpora una proteína o gen EGFR con la mutación T790M) que comprende la coadministración a dicho paciente de (o la puesta en contacto de dicho tumor con) un primer compuesto que se une a y/o inhibe la señalización de dicho EGFR con la mutación T790M en combinación con un segundo compuesto que se une a y/o inhibe la señalización de EGFR natural o un EGFR que incorpora una mutación activadora. En una realización concreta, dicha mutación activadora es una o más de las descritas en la tabla 1 (distintas de T790M). En una realización concreta, dichos primero y segundo compuestos se administran secuencialmente o concomitantemente. En una realización concreta, dicho segundo compuesto es erlotinib.

[0026] También se desvela un procedimiento para la identificación de compuestos que inhiben la señalización de una proteína EGFR mutante que incorpora la mutación T790M, que comprende la puesta en contacto de dicho

EGFR mutante con un compuesto de prueba en presencia de un sustrato de fosforilación y ATP y la detección de un cambio en el grado de fosforilación de dicho sustrato, según lo cual, una reducción de la fosforilación de dicho sustrato en comparación con un control o en comparación con la fosforilación del sustrato en ausencia del compuesto de prueba indica que dicho compuesto de prueba es un inhibidor de la señalización del EGFR mutante.

- 5 En una realización, dicho procedimiento se lleva a cabo *in vitro* en presencia de un ligando para dicho EGFR mutante, como EGF o TGF- α .

[0027] En una realización concreta, la actividad inhibidora de un compuesto de prueba puede determinarse *in vitro* por el grado de inhibición de la fosforilación de tirosina en un sustrato exógeno (p. ej., Lys₃-gastrina o copolímero al azar poliGluTyr (4: 1) (I. Posner y col., J Biol Chem 267 (29): 20638 – 47 (1992)) por la cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico por un compuesto de prueba en relación con un control. Un EGFR humano con la mutación T790M purificado soluble (96 ng) se preincuba en un tubo de microcentrífuga con EGF (2 μ g/ml) en un tampón de fosforilación con vanadato (PBV: HEPES 50 mM, pH 7.4; NaCl 125 mM; MgCl₂ 24 mM; ortovanadato de sodio 100 μ M), en un volumen total de 10 μ l, durante 20 – 30 minutos a temperatura ambiente. El compuesto de prueba disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) se diluye en PBV y 10 μ l se mezclan con la mezcla de EGFR mutante y EGF y se incuban durante 10 – 30 minutos a 30 °C. La reacción de fosforilación se inicia por la adición de 20 μ l de una mezcla de ³³P-ATP y sustrato (Lys₃-gastrina 120 μ M (secuencia de aminoácidos en el código de una sola letra KKKGPWLEEEEEAYGWLDF – SEQ ID NO: 38); Hepes 50 mM, pH 7.4; ATP 40 μ M; γ -[³³P]-ATP 2 μ Ci) a la mezcla de EGFR mutante y EGF y se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene por la adición de 10 μ l de disolución de parada (EDTA 0,5 M, pH 8; ATP 2 mM) y 6 μ l de HCl 2N. Los tubos se centrifugan a 14.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Se pipetea 35 μ l del sobrenadante de cada tubo sobre círculos de 2,5 cm de papel Whatman P81, que se lavan cuatro veces todos juntos en ácido acético al 5 %, con 1 l por lavado y después se secan al aire. Esto resulta en la unión del sustrato al papel con pérdida de ATP libre en el lavado. El [³³P] incorporado se mide por recuento de centelleo en líquido. La incorporación en ausencia de sustrato (p. ej., Lys₃-gastrina) se sustrae de todos los valores como un valor de fondo y se calcula el porcentaje de inhibición con respecto a los controles sin compuesto de prueba presente. Tales ensayos, llevados a cabo con una serie de dosis de los compuestos de prueba, permiten la determinación de un valor de CI₅₀ aproximado para la inhibición *in vitro* de la actividad cinasa de EGFR con la mutación T790M.

[0028] También se desvela un procedimiento para la identificación de un tumor sensible al tratamiento en un sujeto humano que comprende la determinación de la presencia de un gen EGFR mutado o una proteína EGFR mutada en una muestra de dicho tumor, en que dicha mutación se localiza en los exones 18 – 21 de EGFR, según lo cual, la presencia de un gen EGFR mutado o una proteína EGFR mutada indica que el tumor es sensible al tratamiento con un agente contra el cáncer. En una realización concreta, el agente contra el cáncer es un agente quimioterapéutico que puede ser citotóxico o citostático. Los tumores incluyen neuroblastoma, carcinomas intestinales, como carcinoma de recto, carcinoma de colon, carcinoma de poliposis adenomatosa familiar y cáncer colorrectal hereditario no poliposo, carcinoma esofágico, carcinoma labial, carcinoma de laringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma lingual, carcinoma de glándulas salivales, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma renal, carcinoma del parénquima renal, carcinoma ovárico, carcinoma cervical, carcinoma del cuerpo uterino, carcinoma de endometrio, coriocarcinoma, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, carcinoma testicular, carcinoma de mama, carcinoma urinario, melanoma, tumores cerebrales como glioblastoma, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma y tumores neuroectodérmicos periféricos, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, leucemia linfática aguda (LLA), leucemia linfática crónica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), linfoma/leucemia de linfocitos T de adultos, carcinoma hepatocelular, carcinoma de la vesícula biliar, carcinoma bronquial, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, mieloma múltiple, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma de coroides, seminoma, rhabdomyosarcoma, craneofaringioma, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Ewing y plasmocitoma. Algunos tumores concretos incluyen los del cerebro, hígado, riñón, vejiga, mama, gástricos, ováricos, colorrectales, de próstata, páncreas, mama, pulmón, vulva, tiroides, colorrectales, de esófago, carcinomas hepáticos, sarcomas, glioblastomas, tumores de cuello y cabeza, leucemias y tumores linfoides.

[0029] Algunos agentes quimioterapéuticos concretos incluyen, pero no se limitan a (i) antimetabolitos como citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea o metotrexato; (ii) agentes de fragmentación de ADN como bleomicina, (iii) agentes de entrecruzamiento de ADN como clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida o mostaza nitrogenada; (iv) agentes intercalantes como adriamicina (doxorubicina) o mitoxantrona; (v) inhibidores de la síntesis de proteínas como L-asparaginasa, cicloheximida, puromicina o toxina de la difteria; (vi) inhibidores de topoisomerasa I como camptotecina o topotecán; (vii) inhibidores de topoisomerasa II como etopósido (VP-16) o tenipósido; (viii) agentes dirigidos a los microtúbulos como colcemida, colchicina, paclitaxel, vinblastina o vincristina; (ix) inhibidores de cinasas como flavopiridol, estaurosporina, STI571 (CPG 57148B) o UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina); (x) agentes misceláneos en investigación como tioplatino, PS 341, fenilbutirato; ET-18-OCH₃ o inhibidores de farnesil-transferasa (L-739749, L-744832); polifenoles como quercetina, resveratrol, piceatanol, galato de epigallocatequina, teaflavinas, flavanoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados de estos; (xi) hormonas como glucocorticoides o fenretinida; (xii) antagonistas de hormonas como tamoxifeno, finasterida o antagonistas de LHRH. En una realización, el compuesto quimioterapéutico es uno o más de entre gemcitabina, cisplatino, doxorubicina, daunorubicina, paclitaxel, taxotera y mitomicina C. En una realización concreta, el

compuesto quimioterapéutico es uno o más de entre gemcitabina, cisplatino y paclitaxel. En otra realización, el tratamiento es un inhibidor de EGFR. En una realización, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo como ErbituxTM (cetuximab, Imclone Systems Inc.) y ABX-EGF (panitumumab, Abgenix, Inc.). En otra realización, el inhibidor de EGFR es una molécula pequeña que compite con ATP como TarcevaTM (erlotinib, OSI Pharmaceuticals), IressaTM (gefitinib, Astra-Zeneca), tirfostinas descritas por Dvir y col., J Cell Biol 113: 857 – 865 (1991); compuestos tricíclicos de pirimidina desvelados en la patente de los EE. UU. 5.679.683; el compuesto 6-(2,6-diclorofenil)-2-(4-(2-dietilaminoetoxi)fenilamino)-8-metil-8H-pirido(2,3-d)pirimidin-7-ona (conocido como PD 166285) desvelado en Panek y col., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283: 1433 – 1444 (1997).

10 **[0030]** También se desvela un procedimiento para la identificación de una mutación en EGFR en una muestra que comprende la puesta en contacto de un ácido nucleico de dicha muestra con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada o un fragmento del mismo que incorpora una mutación y la detección de dicha hibridación. En una realización concreta, dicha sonda se marca para su detección, por ejemplo, con un radioisótopo (³H, ³²P, ³³P, etc.), un agente fluorescente (rodamina, 15 fluoresceína, etc.) o un agente cromogénico. En una realización concreta, la sonda es un oligómero no codificante, por ejemplo, APN, fosforoamidatos de morfolina, ANB o 2'-alcoxialcoxi. La sonda puede ser de aproximadamente ocho nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos o de aproximadamente diez a aproximadamente 75, de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. En otro aspecto, dichas sondas se proporcionan en un kit para la identificación de mutaciones en EGFR en una muestra, en 20 que dicho kit comprende un oligonucleótido que hibrida específicamente con un sitio de mutación en el gen EGFR o con un sitio adyacente al anterior. Además, el kit puede comprender instrucciones para el tratamiento de pacientes con tumores que contienen mutaciones en EGFR con un inhibidor de EGFR sobre la base del resultado de una prueba de hibridación mediante el uso del kit.

25 **[0031]** También se desvela un procedimiento para la detección de un gen EGFR mutado en una muestra que comprende la amplificación de un ácido nucleico de dicha muestra que corresponde al dominio de cinasa de dicho gen EGFR, o a los exones 18 – 21, o a un fragmento del mismo del que se sospecha que contiene una mutación y la comparación de la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del gen EGFR natural correspondiente o fragmento del mismo. Una diferencia en la movilidad indica la presencia de una 30 mutación en la secuencia de ácido nucleico amplificada. La movilidad electroforética puede determinarse en un gel de poliacrilamida.

[0032] Alternativamente, el ácido nucleico del gen o fragmento del gen EGFR amplificado puede analizarse para la detección de mutaciones mediante el procedimiento de detección enzimática de mutaciones (EMD) (Del Tito 35 y col., Clinical Chemistry 44: 731 – 739, 1998). El procedimiento EMD usa la endonucleasa VII de T₄, una resolvase bacteriofágica, que recorre el ADN bicatenario hasta que detecta y corta las distorsiones estructurales causadas por apareamientos de bases erróneos que resultan de mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. La detección, por ejemplo, mediante electroforesis en gel, de dos fragmentos de poca longitud formados por el corte con la resolvase, indica la presencia de una mutación. Los beneficios del procedimiento EMD son un único protocolo para 40 la identificación de mutaciones puntuales, deleciones e inserciones que se aplica directamente sobre reacciones de PCR, con lo que se elimina la necesidad de purificar la muestra, se reduce el tiempo de hibridación y se aumenta la relación entre la señal y el ruido. Es posible analizar muestras mixtas que contienen un exceso de hasta 20 veces de ADN normal y fragmentos de un tamaño de hasta 4 kb. Sin embargo, el procedimiento EMD no identifica los cambios de bases concretos producidos en las muestras positivas para mutación, con lo que se requieren procedimientos 45 adicionales de secuenciación para identificar la mutación en caso es necesario. La enzima CEL I puede usarse de manera similar a la resolvase endonucleasa VII de T₄, según se demuestra en el documento US5869245.

[0033] Otro kit simple para la detección de mutaciones de EGFR es una tira de prueba para hibridación inversa similar al ensayo Haemochromatosis StripAssayTM (Viennalabs, <http://www.bamburghmarrsh.com/pdf/4220.pdf>) para la detección de múltiples mutaciones en los genes HFE, TFR2 y 50 FPN1, causantes de hemocromatosis. Un ensayo tal se basa en una hibridación específica de la secuencia después de la amplificación por PCR. Para ensayos de mutaciones únicas, puede aplicarse un sistema de detección basado en una microplaca, mientras que para ensayos de mutaciones múltiples, las tiras de prueba pueden usarse como "macromatrices". Los kits pueden incluir reactivos listos para usar para la extracción de ADN de las muestras, la 55 amplificación y la detección de la mutación. Los protocolos de amplificación multiplex proporcionan comodidad y permiten la prueba de muestras con volúmenes muy limitados. Mediante el sencillo formato del StripAssay, puede llevarse a cabo la prueba de 20 y más mutaciones en menos de cinco horas sin un equipamiento costoso. El ADN se aísla de una muestra y el gen EGFR (o los exones 18 – 21 o el KDR o segmentos del mismo) se amplifica *in vitro* (p. ej., por PCR) y se marca con biotina, preferentemente en una reacción de amplificación única ("multiplex"). Los 60 productos de PCR se hibridan selectivamente con sondas oligonucleotídicas (específicas del tipo natural y del mutante) inmovilizadas sobre un soporte sólido como una tira de prueba, en la que las sondas están inmovilizadas como líneas o bandas paralelas. Los amplicones biotinilados unidos se detectan con estreptavidina-fosfatasa alcalina y sustratos coloreados. Un ensayo tal puede detectar todas las mutaciones de la tabla 1 o un subconjunto de las mismas. Con respecto a una banda de una sonda mutante concreta, es posible uno de los tres patrones de 65 señalización siguientes: (i) una banda solo para la sonda natural que indica un EGFR normal, (ii) bandas para la sonda natural y una sonda mutante que indican un genotipo heterocigoto y (iii) una banda solo para la sonda

mutante que indica un genotipo mutante de EGFR homocigoto. Por consiguiente, se proporciona además un procedimiento para la detección de mutaciones de EGFR que comprende el aislamiento de un ácido nucleico de una muestra, la amplificación del gen EGFR o de un fragmento del mismo (p. ej., el KDR o los exones 18 – 21 o de menor tamaño), de modo que el ácido nucleico amplificado comprende un ligando, la puesta en contacto del gen o
 5 fragmento del gen EGFR amplificado con una sonda que comprende un compuesto detectable de unión con el ligando, en que la sonda es capaz de hibridar específicamente con una mutación en EGFR y después la detección de la hibridación de dicha sonda con dicho gen o fragmento del gen EGFR amplificado. En una realización concreta, el ligando es biotina y el compuesto de unión comprende avidina o estreptavidina. En una realización concreta, el compuesto de unión es estreptavidina-fosfatasa alcalina que es detectable con sustratos coloreados. En una
 10 realización concreta, las sondas se inmovilizan, por ejemplo, en una tira de prueba, en la que las sondas complementarias de diferentes mutaciones están separadas entre sí. Alternativamente, el ácido nucleico amplificado se marca con un radioisótopo, en cuyo caso la sonda no necesita comprender un ligando.

[0034] Las muestras de tumores se analizaron también con respecto a mutaciones en KRAS (denominado como p21a). Las mutaciones concretas detectadas en el exón 1 son: G12C, G12A, G12D, G12R, G12S, G12V, G13C y G13D que se correlacionan con un mal pronóstico con quimioterapia, así como con quimioterapia más el tratamiento con erlotinib. Por consiguiente, la descripción proporciona además un procedimiento para la identificación de pacientes que no son sensibles al tratamiento con un inhibidor de EGFR como erlotinib o a erlotinib en combinación con quimioterapia que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una mutación en
 20 KRAS, según lo cual, la presencia de dicha mutación indica un paciente que no responderá a dicha terapia. Alternativamente, se proporciona un procedimiento para la identificación de un tumor sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR en un sujeto humano que comprende (i) la determinación de la presencia de una proteína o gen KRAS natural en una muestra de dicho tumor, según lo cual, la presencia de una proteína o gen KRAS natural indica que el tumor es sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR o (ii) la determinación de la presencia de un gen o
 25 proteína KRAS mutados en una muestra de dicho tumor, según lo cual, la ausencia de una proteína o gen KRAS mutados indica que el tumor es sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR. En una realización concreta, la mutación en KRAS es una mutación activadora. En una realización concreta, la mutación es en el exón 1 de KRAS. En otra realización, la mutación en KRAS es al menos una de entre G12C, G12A, G12D, G12R, G12S, G12V, G13C y G13D. Alternativamente, los individuos que tienen tumores con KRAS mutante pueden tratarse con inhibidores de
 30 EGFR cuando también se tratan con un inhibidor de KRAS, antes, después o durante el tratamiento con el inhibidor de EGFR. Los procedimientos para determinar la presencia de mutaciones en KRAS son análogos a los usados para identificar mutaciones en EGFR descritos en detalle en este documento.

[0035] Se observó además que los pacientes en cuyos tumores se encontró la presencia de mutaciones en
 35 KRAS y se teñían positivamente para EGFR mediante IHQ presentaban una supervivencia significativamente inferior al tratarlos con erlotinib en combinación con quimioterapia, en comparación con aquellos pacientes tratados solamente con quimioterapia. Las tablas 3 y 4 siguientes resumen estos resultados. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento, según se define en las reivindicaciones, para la identificación de un paciente que no es sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR como erlotinib en combinación con un agente quimioterapéutico
 40 que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una mutación en KRAS y un EGFR en un tumor de dicho paciente, según lo cual, la presencia simultánea de una mutación en KRAS y un EGFR en dicho tumor indica que el paciente no responderá a dicho tratamiento con un inhibidor de EGFR en combinación con quimioterapia. En este contexto “no sensible” significa que el paciente no presentará una respuesta de acuerdo con los criterios RECIST o que tendrá una supervivencia inferior a la de un paciente similar (con mutaciones en KRAS y la presencia
 45 de EGFR en un tumor) tratado solamente con quimioterapia. Dicho EGFR puede ser tanto un EGFR mutante como natural y puede determinarse por cualquier técnica, incluidas, pero sin limitarse a las descritas en este documento. Las mutaciones en KRAS se refieren a mutaciones en la proteína o ácido nucleico KRAS y se detectan mediante procedimientos análogos a los usados para la detección de las mutaciones en EGFR. En una realización, la presencia de EGFR se determina mediante inmunohistoquímica (IHQ). En otra realización, la presencia de EGFR se
 50 determina mediante detección por hibridación fluorescente *in situ* de un aumento de las cantidades de ácido nucleico de EGFR en comparación con una célula normal. En otra realización, el EGFR es el EGFR natural. En otra realización, el EGFR es un EGFR mutante. En una realización concreta, la falta de respuesta es una falta de respuesta completa (RC) de acuerdo con los criterios RECIST. En otra realización, la falta de respuesta es una falta de respuesta parcial (RP) de acuerdo con los criterios RECIST. En otra realización, la falta de respuesta es la falta
 55 de una enfermedad estable (EE) de acuerdo con los criterios RECIST. En otra realización, la falta de respuesta es un periodo de supervivencia reducido.

[0036] Alternativamente, se proporciona un procedimiento según se define en las reivindicaciones para la determinación de si un tumor responderá al tratamiento con un inhibidor de EGFR en combinación con un agente
 60 quimioterapéutico, que comprende la determinación de la presencia de una proteína o ácido nucleico KRAS y un EGFR en una muestra de dicho tumor, según lo cual, la presencia simultánea de la proteína o ácido nucleico KRAS mutante y un EGFR indica que el tumor no responderá al tratamiento con un inhibidor de EGFR. En este contexto, “responde” significa que el tumor se reduce en tamaño o volumen o que se reduce la tasa de aumento de tamaño o volumen. En una realización concreta, dicho tratamiento con un inhibidor de EGFR es anterior, simultáneo o
 65 posterior al tratamiento con quimioterapia.

Tabla 3

	KRAS natural	
	Erlotinib + quimioterapia	Solo quimioterapia
EGFR IHQ-		
n	48	56
Mediana de la SG (meses) (IC del 95 %)	12,1 (9,0, 16,6)	12,7 (9,1, 16,8)
Valor P de la prueba de rango logarítmico	0,9557	
EGFR IHQ +		
n	53	38
Mediana de la SG (meses) (IC del 95 %)	12,1 (8,0, 16,6)	10,3 (8,3, .)
Valor P de la prueba de rango logarítmico	0,7892	
Cociente de riesgos instantáneos (IC del 95 %)	1,1 (0,6, 1,9)	

Tabla 4

5

	KRAS mutante	
	Erlotinib + quimioterapia	Solo quimioterapia
EGFR IHQ-		
n	11	9
Mediana de la SG (meses) (IC del 95 %)	9,0 (3,4, 12,9)	12,8 (3,3, .)
Valor P de la prueba de rango logarítmico	0,5507	
EGFR IHQ +		
n	12	20
Mediana de la SG (meses) (IC del 95 %)	3,4 (2,1, 4,4)	13,5 (11,1, 15,1)
Valor P de la prueba de rango logarítmico	< 0,001	
Cociente de riesgos instantáneos (IC del 95 %)	4,9 (2,1, 11,5)	

10 **[0037]** Las alteraciones de un gen natural de acuerdo con la presente invención abarcan todas las formas de mutación como inserciones, inversiones, deleciones y/o mutaciones puntuales. Las mutaciones somáticas son aquellas que solo se producen en ciertos tejidos, por ejemplo en el tejido tumoral, y que no se heredan en la línea germinal. Las mutaciones de la línea germinal pueden encontrarse en cualquier tejido del cuerpo. La mutación somática de uno solo de los alelos indica un estado neoplásico temprano. Sin embargo, la mutación de los dos alelos indica un estado neoplásico tardío.

15 **[0038]** De acuerdo con el procedimiento de diagnóstico y pronóstico de la presente descripción, se detecta la alteración del gen EGFR natural. Por lo tanto, la detección de mutaciones en EGFR es un indicador de diagnóstico y pronóstico según se describe en este documento.

20 **[0039]** Las mutaciones en EGFR encontradas en tejidos tumorales pueden resultar en un aumento de la actividad de señalización, con respecto a EGFR natural, que conduce a un estado canceroso. Con el fin de detectar la alteración del gen EGFR natural, se obtiene una muestra o biopsia del tumor por los procedimientos bien conocidos en la técnica, apropiados para el tipo y localización concretas del tumor. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de cáncer de pulmón por resección, broncoscopia, aspiración con aguja fina, cepillado bronquial o de esputo, líquido pleural o sangre. Los procedimientos para el enriquecimiento de una preparación de tejido en células tumorales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tejido puede aislarse de secciones de parafina o de criostato.

25 Las células cancerosas también pueden separarse de las células normales por citometría de flujo o microdissección por captura con láser. Estos, al igual que otros procedimientos para la separación de las células tumorales de las células normales son bien conocidas en la técnica. Si el tejido tumoral está muy contaminado con células normales, la detección de las mutaciones es más difícil.

30 **[0040]** La detección de mutaciones puntuales puede llevarse a cabo por clonación molecular del alelo (o alelos) de EGFR y secuenciación de dicho(s) alelo(s) mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, puede usarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias génicas directamente a partir de una preparación de ADN genómico del tejido tumoral. La secuencia de ADN de las

secuencias amplificadas puede determinarse y las mutaciones pueden identificarse a partir de esta. La reacción en cadena de la polimerasa es bien conocida en la técnica y se describe en Saiki y col., Science 239: 487, 1988; documento U.S. 4.683.203 y documento U. S. 4.683.195.

- 5 **[0041]** Los pares de cebadores específicos que pueden usarse para la amplificación por PCR de los exones 18 – 21 de EGFR incluyen:

< 5pEGFR.ex18.out > CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC (SEQ ID NO: 39)

< 3pEGFR.ex18.out > GAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC (SEQ ID NO: 40)

10

< 5pEGFR.ex19.out > GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC (SEQ ID NO: 41)

< 3pEGFR.ex19.out > CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG (SEQ ID NO: 42)

< 5pEGFR.ex20.out > CCATGAGTACGTATTTTGAACTC (SEQ ID NO: 43)

15 < 3pEGFR.ex20.out > CATATCCCCATGGCAAACCTTTGC (SEQ ID NO: 44)

< 5pEGFR.ex21.out > CTAACGTTCCGCCAGCCATAAGTCC (SEQ ID NO: 45)

< 3pEGFR.ex21.out > GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG (SEQ ID NO: 46)

20 < 5pEGFR.ex18.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTCAAGTGCCGTGCTCTGGCACCCAAGC (SEQ ID NO: 47)

< 3pEGFR.ex18.in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCCCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (SEQ ID NO: 48)

< 5pEGFR.ex19.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTCCTTAGGTGCGGCTCCACAGC (SEQ ID NO: 49)

< 3pEGFR.ex19.in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCCATTTAGGATGTGGAGATGAGC (SEQ ID NO: 50)

25

< 5pEGFR.ex20.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTGAACTCAAGATCGCATTCATGC (SEQ ID NO: 51)

< 3pEGFR.ex20.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTGAACTCAAGATCGCATTCATGC (SEQ ID NO: 51)

< 5pEGFR.ex21.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTCAGCCATAAGTCCTCGACGTGG (SEQ ID NO: 53)

30 < 3pEGFR.ex21.in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCCATCCTCCCCTGCATGTGTTAAAC (SEQ ID NO: 54)

Los pares de cebadores específicos que pueden usarse para la amplificación por PCR del exón 1 de KRAS incluyen:

< 5pKRAS-out > TACTGGTGGAGTATTTGATAGTG (SEQ ID NO: 55)

35 < 3pKRAS-out > CTGTATCAAAGATGGTCCTG (SEQ ID NO: 56)

< 5pKRAS-in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTTAGTGTATTAACCTTATGTG (SEQ ID NO: 57)

< 3pKRAS-in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCACCTCTATTGTTGGATCATATTCG (SEQ ID NO: 58)

- 40 **[0042]** La reacción en cadena de la ligasa, conocida en la técnica, también puede usarse para la amplificación de secuencias de EGFR. Véase Wu y col., Genomics vol. 4, págs. 560 – 569 (1989). Además, puede emplearse una técnica conocida como PCR específica de alelo. (Véase Ruano y Kidd, Nucleic Acids Research, vol. 17, pág. 8392, 1989). De acuerdo con esta técnica, se usan cebadores que hibridan en sus extremos 3' con una mutación concreta de EGFR. Si la mutación concreta de EGFR no está presente, no se observa un producto de amplificación. También
- 45 puede usarse el sistema de mutación resistente a la amplificación (ARMS), según se desvela en la publicación de solicitud de patente europea n° 0332435 y en Newton y col., Nucleic Acids Research, vol. 17, pág. 7, 1989. Las inserciones y deleciones en genes pueden detectarse también mediante clonación, secuenciación y amplificación. Además, pueden usarse sondas de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para el gen o genes marcadores circundantes, con el fin de detectar la alteración de un alelo o una inserción en un fragmento
- 50 polimórfico. También puede usarse el análisis de polimorfismos de conformación de cadena única (SSCP) para detectar variantes de cambios de bases de un alelo. (Orita y col., Proc Natl Acad Sci USA vol. 86, págs. 2766 – 2770, 1989 y Genomics, vol. 5, págs. 874 – 879, 1989). También pueden usarse otros procedimientos para la detección de inserciones y deleciones, según se conocen en la técnica.

- 55 **[0043]** La alteración de genes naturales puede detectarse también sobre la base de la alteración de un producto de expresión natural del gen. Tales productos de expresión incluyen tanto el ARNm de EGFR como el producto proteico de EGFR. Las mutaciones puntuales pueden detectarse mediante la secuenciación y amplificación del ARNm o por medio de la clonación molecular del ADNc producido a partir del ARNm. La secuencia del ADNc clonado puede determinarse mediante procedimientos de secuenciación de ADN bien conocidos en la técnica. El
- 60 ADNc puede secuenciarse también por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- [0044]** Son apareamientos erróneos, de acuerdo con la presente invención, los dúplex de ácidos nucleicos hibridados que no son complementarios al 100 %. La falta de una complementariedad total puede deberse a deleciones, inserciones, inversiones, sustituciones o mutaciones del marco de lectura. La detección de
- 65 apareamientos erróneos puede usarse para detectar mutaciones puntuales en el gen o en su producto de ARNm. Mientras que estas técnicas son menos sensibles que la secuenciación, son más fáciles de realizar en un gran

número de muestras tumorales. Un ejemplo de una técnica de corte de apareamientos erróneos es el procedimiento de protección frente a ARNasa, que se describe en detalle en Winter y col., Proc Natl Acad Sci USA, vol. 82, pág. 7575, 1985 y Meyers y col., Science, vol. 230, pág. 1242, 1985. Este procedimiento implica el uso de una ribosonda marcada complementaria de la secuencia codificante del gen EGFR natural humano (o los exones 18 – 21 o el KDR del mismo). La ribosonda y bien el ARNm o el ADN aislados del tejido tumoral se alinean (hibridan) conjuntamente y a continuación se digieren con la enzima ARNasa A, que es capaz de detectar algunos apareamientos erróneos en una estructura dúplex de ARN. Si la ARNasa detecta un apareamiento erróneo, corta en el sitio de dicho apareamiento erróneo. Por lo tanto, cuando la preparación de ARN alineado se separa en una matriz de gel de electroforesis, si la ARNasa A ha detectado y cortado un apareamiento erróneo, se observará un producto de ARN de menor tamaño que el dúplex de ARN de longitud completa formado por la ribosonda con el ARNm o el ADN. La ribosonda no necesita tener la longitud completa del ARNm o el gen EGFR, sino que puede corresponder a los exones 18 a 21 o al KDR de EGFR o a segmentos del mismo. Si la ribosonda comprende solo un segmento del ARNm o gen EGFR, será deseable usar varias de estas sondas para analizar toda la secuencia de ARNm con respecto a apareamientos erróneos.

[0045] De manera similar, es posible usar sondas de ADN para la detección de apareamientos erróneos a través de un corte enzimático o químico. Véase, por ejemplo, Cotton y col., Proc Natl Acad Sci USA, vol. 85, pág. 4397, 1988 y Shenk y col., Proc Natl Acad Sci USA, vol. 72, pág. 989, 1975. Alternativamente, los apareamientos erróneos pueden detectarse por cambios de la movilidad electroforética de los dúplex con apareamientos erróneos con respecto a los dúplex correctamente apareados. Véase, por ejemplo, Cariello, Human Genetics, vol. 42, pág. 726, 1988. Tanto con ribosondas como con sondas de ADN, el ARNm o ADN celular que pudiera contener una mutación puede amplificarse mediante PCR antes de la hibridación. También es posible la detección de cambios en el ADN del gen EGFR mediante hibridación de Southern, especialmente si los cambios son reorganizaciones de importancia, como deleciones o inserciones.

[0046] Las secuencias de ADN del gen EGFR amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa pueden analizarse también con sondas específicas de un alelo. Estas sondas son oligómeros de ácido nucleico, cada uno de los cuales contiene una región de la secuencia del gen EGFR con una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede tener una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos, correspondientes a una porción de la secuencia del gen EGFR. Mediante el uso de una batería de tales sondas específicas de alelo, pueden analizarse los productos de amplificación por PCR para detectar la presencia de una mutación previamente identificada en el gen EGFR. La hibridación de sondas específicas de alelo con las secuencias amplificadas de EGFR puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un filtro de nailon. La hibridación con una sonda concreta en condiciones de hibridación restrictivas indica la presencia de la misma mutación en el tejido tumoral que en la sonda específica de un alelo.

[0047] Las secuencias de ADN del gen EGFR que han sido amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa también pueden analizarse para identificar mutaciones por técnicas de espectroscopía de masas. Las regiones amplificadas del gen con una mutación tendrán un patrón espectroscópico de masas distinto del de la misma región sin mutaciones.

[0048] La alteración de los genes EGFR naturales puede detectarse también mediante la identificación de alteraciones de la proteína EGFR natural. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales inmunorreactivos con EGFR para analizar un tejido. La falta de un antígeno afín indicará una mutación en EGFR. Para detectar un producto mutante del gen EGFR también podrían usarse anticuerpos específicos para los productos de alelos mutantes. Los anticuerpos pueden identificarse a partir de colecciones de fagos que exponen estas moléculas. Tales ensayos inmunológicos pueden realizarse en cualquier formato conveniente conocido en la técnica. Estos incluyen, ensayos de inmunotransferencia, ensayos inmunohistoquímicos y ensayos ELISA. Cualquier procedimiento para la detección de una proteína EGFR alterada puede usarse para la detección de una alteración de los genes EGFR naturales.

[0049] Los genes o productos génicos mutantes de EGFR pueden detectarse a partir de tumores o de otras muestras corporales como orina, esputo o suero. Las mismas técnicas discutidas anteriormente para la detección de genes o productos génicos mutantes de EGFR en muestras tumorales pueden aplicarse a las otras muestras corporales. Las células cancerosas se desprenden de los tumores y aparecen en tales muestras corporales. Al analizar tales muestras corporales puede conseguirse un sencillo diagnóstico temprano para muchos tipos de cáncer. Además, el progreso de la quimioterapia o la radioterapia puede controlarse más fácilmente mediante el análisis de tales muestras corporales con respecto a la presencia de genes o productos génicos mutantes de EGFR.

[0050] Los procedimientos de diagnóstico de la presente invención pueden aplicarse a cualquier tumor en el que EGFR desempeñe un papel en la tumorigénesis, por ejemplo, de pulmón, mama, colon, glioma, vejiga, estómago y próstata. El procedimiento de diagnóstico de la presente invención es útil para los médicos, para poder decidir sobre el tratamiento adecuado. Por ejemplo, un tumor que muestre alteración en los dos alelos de EGFR podría sugerir un régimen de tratamiento más agresivo que un tumor que muestre un solo alelo de EGFR alterado.

[0051] Los pares de cebadores de la presente descripción son útiles para la determinación de la secuencia

nucleotídica de un alelo concreto de EGFR mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los pares de cebadores de ADN monocatenario pueden alinearse con secuencias dentro o alrededor del gen EGFR con el fin de cebar la síntesis de amplificación del ADN del gen EGFR mismo. Un conjunto de estos cebadores permite la síntesis de todos los nucleótidos de los exones 18 a 21 de EGFR. También pueden usarse cebadores específicos de un alelo. Tales cebadores se alinean solo con alelos mutantes concretos de EGFR y, por lo tanto, solo amplificarán un producto en presencia del alelo mutante como molde. Con el fin de facilitar la clonación subsiguiente de las secuencias amplificadas, los cebadores pueden tener secuencias de sitios para enzimas de restricción añadidas a sus extremos. Por lo tanto, todos los nucleótidos de los cebadores derivan de los exones 18 – 21 de EGFR o de secuencias adyacentes a estos, excepto por los pocos nucleótidos necesarios para formar un sitio para una enzima de restricción. Tales enzimas y sitios son bien conocidos en la técnica. Los cebadores mismos pueden sintetizarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Generalmente, los cebadores pueden prepararse con máquinas sintetizadoras de oligonucleótidos, disponibles en el comercio. El diseño de cebadores concretos se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

15 **[0052]** Las sondas de ácido nucleico proporcionadas por la presente descripción son útiles para una serie de finalidades. Pueden utilizarse en una hibridación de Southern con ADN genómico y en el procedimiento de protección frente a ARNasa para la detección de mutaciones puntuales discutido anteriormente. Las sondas pueden usarse para la detección de productos de amplificación por PCR. También pueden usarse para la detección de apareamientos erróneos con el gen EGFR o su ARNm mediante otras técnicas. Los apareamientos erróneos pueden detectarse mediante enzimas (p. ej., nucleasa S1), compuestos químicos (p. ej., hidroxilamina o tetróxido de osmio y piperidina) o cambios en la movilidad electroforética de los híbridos apareados erróneamente en comparación con los híbridos perfectamente apareados. Estos procedimientos son conocidos en la técnica. Véase Novack y col., Proc Natl Acad Sci USA, vol. 83, pág. 586, 1986. Generalmente, las sondas son complementarias de las secuencias de los exones 18 – 21 de EGFR, aunque generalmente también se contemplan sondas para el dominio de cinasa y segmentos del mismo. Es posible usar una batería completa de sondas de ácido nucleico para componer un kit para la detección de la alteración de genes EGFR naturales. El kit permite la hibridación de toda la secuencia de los exones 18 – 21 del gen EGFR. Las sondas pueden solaparse entre sí o ser contiguas.

30 **[0053]** Si se usa una ribosonda para la detección de apareamientos erróneos con ARNm, esta es complementaria del ARNm del gen EGFR. Por lo tanto, la ribosonda es una sonda no codificante, en el sentido de que no codifica la proteína EGFR porque es complementaria de la cadena codificante. Generalmente, la ribosonda se marca con material radiactivo, colorimétrico o fluorimétrico, lo que puede realizarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Si la ribosonda se utiliza para la detección de apareamientos erróneos con ADN, esta puede ser de cualquier polaridad, codificante o no codificante. De manera similar, también pueden usarse sondas de ADN para la detección de apareamientos erróneos.

40 **[0054]** La predisposición a cánceres puede averiguarse mediante el análisis de cualquier tejido de un humano con respecto a la presencia de mutaciones del gen EGFR. Por ejemplo, una persona que ha heredado una mutación en EGFR de línea germinal será propensa a padecer cáncer. Esto puede determinarse mediante el análisis del ADN de cualquier tejido corporal. Por ejemplo, puede extraerse sangre y, de las células de la sangre, extraerse el ADN. Además, puede llevarse a cabo un diagnóstico prenatal mediante el análisis de células fetales, células placentarias o líquido amniótico con respecto a la presencia de mutaciones del gen EGFR. Una alteración de un alelo natural de EGFR, por ejemplo, por mutación puntual o por delección, puede detectarse por cualquiera de los procedimientos discutidos anteriormente.

45 **EJEMPLOS:**

Ejemplo 1 Preparaciones sobre portaobjetos – desparafinado y tinción

50 **[0055]** Secciones sumergidas en las disoluciones siguientes:

xilenos recién preparados (para desparafinar las secciones) – 5 min

xilenos recién preparados – 5 min

etanol al 100 % – 15 s

55 etanol al 95 % – 15 s

etanol al 70 % – 15 s

agua desionizada – 15 s

hematoxilina de Mayer – 30 s

agua desionizada – lavado (x 2) – 15 s

60 etanol al 70 % – 15 s

eosina Y – 15 s

etanol al 95 % – 15 s

etanol al 95 % – 15 s

etanol al 100 % – 15 s

65 etanol al 100 % – 15 s

xilenos (para asegurar la deshidratación de la sección) – 60 s

Secado al aire durante aproximadamente 2 minutos o mediante el uso suave de aire comprimido para eliminar completamente los xilenos. El tejido quedó así listo para microdissección por captura con láser (LCM).

5 **Ejemplo 2** Microdissección por captura con láser y extracción de ADN

Materiales:

[0056]

- 10 Sistema de LCM PixCell II
- Tapones para LCM CapSure HS o CapSure Macro
- Dispositivo ExtractSure (sólo HS)
- Cuchillas (estériles de fábrica)
- 15 Tubos de 0,5 ml
- Tubos de 0,2 ml
- Kit de extracción de ADN PicoPure
- Incubador de 65 °C

20 Procedimiento:

[0057]

- Tapón CapSure colocado sobre el área de tejido que debía recogerse.
- 25 2. Láser aplicado sobre el área deseada.
- Tapón levantado del tejido.
- 20 µl de tampón de digestión PicoPure junto con proteinasa K añadidos a un tubo de 0,5 ml.
- Tapón con el material diseccionado colocado en el tubo para cerrarlo firmemente.
- Tubo invertido para que el tampón de digestión cubriera el tapón.
- 30 Incubado a 65 °C durante 24 horas.
- Tubo con el tapón centrifugado para recoger el material digerido en el fondo del tubo.
- Digerido transferido a tubos en tira de 0,2 ml.
- Proteinasa K inactivada a 95 °C durante 10 minutos en un termociclador con tapa caliente.
- 10. Uso de 1 – 2 µl de la muestra en una reacción de PCR de 50 µl. No se necesitó purificación.

35

Ejemplo 3 Amplificación por PCR

Cebadores de PCR:

- 40 [0058] Se diseñaron pares de cebadores para cada exón por secuenciar (exones 18, 19, 20 y 21 de EGFR).
- Las secuencias de los cebadores usados fueron las siguientes:

- < 5pEGFR.ex18.out > CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC (SEQ ID NO: 39)
- < 3pEGFR.ex18.out > GAGTTTCCCAACACTCAGTGAAAC (SEQ ID NO: 40)
- 45 < 5pEGFR.ex19.out > GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC (SEQ ID NO: 41)
- < 3pEGFR.ex19.out > CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG (SEQ ID NO: 42)
- < 5pEGFR.ex20.out > CCATGAGTACGTATTTTGAACTC (SEQ ID NO: 43)
- 50 < 3pEGFR.ex20.out > CATATCCCCATGGCAAACCTTTGC (SEQ ID NO: 44)
- < 5pEGFR.ex21.out > CTAACGTTCCGCCAGCCATAAGTCC (SEQ ID NO: 45)
- < 3pEGFR.ex21.out > GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG (SEQ ID NO: 46)
- 55 < 5pEGFR.ex18.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTCAAGTGCCGTGCTCTGGCACCCAAGC (SEQ ID NO: 47)
- < 3pEGFR.ex18.in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCCCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (SEQ ID NO: 48)
- < 5pEGFR.ex19.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTCCTTAGGTGCGGCTCCACAGC (SEQ ID NO: 49)
- < 3pEGFR.ex19.in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCCATTTAGGATGTGGAGATGAGC (SEQ ID NO: 50)
- 60 < 5pEGFR.ex20.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTGAAACTCAAGATCGCATTCATGC (SEQ ID NO: 51)
- < 5pEGFR.ex20.in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCGCAAACCTTTGCTATCCCAGGAG (SEQ ID NO: 52)
- < 5pEGFR.ex21.in.m13f > TGTA AACGACGGCCAGTCAGCCATAAGTCCTCGACGTGG (SEQ ID NO: 53)
- 65 < 3pEGFR.ex21.in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCCATCCTCCCCTGCATGTGTAAAC (SEQ ID NO: 54)

Oligonucleótidos de KRAS para PCR:

[0059]

- 5 < 5pKRAS-out > TACTGGTGGAGTATTTGATAGTG (SEQ ID NO: 55)
 < 3pKRAS-out > CTGTATCAAAGAATGGTCCTG (SEQ ID NO: 56)
- < 5pKRAS-in.m13f > TGTAACACGACGGCCAGTTAGTGTATTAACCTTATGTG (SEQ ID NO: 57)
 < 3pKRAS-in.m13r > CAGGAAACAGCTATGACCACCTCTATTGTTGGATCATATTTCG (SEQ ID NO: 58)

10

[0060] Se llevó a cabo una amplificación anidada del producto primario de PCR con pares de cebadores específicos de los intrones localizados dentro del producto primario de PCR. Los pares de cebadores anidados se etiquetaron con las secuencias M13f y M13rev.

15 Primera tanda de PCR:

Reacción de PCR:

[0061]

20

- ADN 0,5 a 30 ng
 Cebadores 250 nM de cada cebador exterior (out)
 dNTP 0,2 mM de cada uno (Roche, n° de catálogo 1581295)
 MgCl₂ 1,5 mM (tampón 10 x, 15 mM)
- 25 Enzima 1,5 U/reacción de Taq de alta fidelidad Expand (Roche, n° de catálogo 1759078)
 50 µl de volumen de reacción

Condiciones del termociclador:

30 **[0062]**

- 95 °C – 3 minutos
 94 °C – 30 segundos repetido 35 veces
 58 °C – 30 segundos
- 35 72 °C – 1 minuto
 72 °C – 8 minutos
 4 °C – permanente

Segunda tanda de PCR:

40

Reacción de PCR:

[0063]

- 45 ADN 1 µl de la reacción de PCR de la primera tanda
 Cebadores 250 nM de cada cebador interior (in)
 dNTP 0,2 mM de cada uno (Roche, n° de catálogo 1581295)
 MgCl₂ 1,5 mM (tampón 10 x, 15 mM)
 Enzima 1,5 U/reacción de Taq de alta fidelidad Expand (Roche, n° de catálogo 1759078)
- 50 50 µl de volumen de reacción

Condiciones del termociclador:

[0064]

55

- 95 °C – 3 minutos
 94 °C – 30 segundos repetido 30 veces
 58 °C – 30 segundos
- 60 72 °C – 1 minuto
 72 °C – 8 minutos
 4 °C – permanente

Aislamiento de los productos de PCR:

- 65 **[0065]** Los productos de las reacciones de PCR se separaron en geles de agarosa E-Gel al 2 % (Invitrogen, n° de catálogo G6018-02) para el control de calidad. Los productos de PCR se purificaron directamente mediante el kit

de purificación Qiaquick 96 PCR (Qiagen, n° de catálogo 28181) o se purificaron en gel en caso necesario. Para la purificación en gel, el producto de PCR se escindió del E-Gel y el ADN se purificó mediante el kit de purificación Qiaquick 96 PCR con un protocolo de extracción de gel (Qiagen, n° de catálogo 28181).

5 **Ejemplo 4 Secuenciación**

[0066] Para la secuenciación de los productos de PCR purificados, se usaron cebadores de secuenciación anidados o los cebadores de secuenciación estándar M13f y M13rev para los productos de PCR etiquetados. Las secuencias fueron las siguientes:

10

< m13f > TGTAACGACGGCCAGT (SEQ ID NO: 59)
< m13r > CAGGAAACAGCTATGACC (SEQ ID NO: 60)

[0067] Los productos de PCR purificados se diluyeron y se secuenciaron en ciclos con el kit BigDye Terminator (ABI, Foster City, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15

Mezcla de reacción:

[0068]

20

5 µl de ADN (25 – 100 ng de producto de PCR)
6 µl de agua
1 µl de cebador diluido con agua a 0,25 DO/100µl (m13f o m13r o un cebador específico de la secuencia)
2 µl de BigDye v3.1
25 6 µl de tampón de dilución (equivalente del tampón de dilución ABI 5x)

Secuenciación en ciclos:

Condiciones:

30

[0069]

96 °C – 2,5 minutos – desnaturalización inicial
96 °C – 10 segundos
35 50 °C – 5 segundos
60 °C – 4 minutos
repetido por un total de 25 a 50 ciclos

Purificación de la reacción:

40

[0070] Los nucleótidos no incorporados se eliminan mediante:

Sephadex al 8 %
500 µl en un bloque de 96 pocillos Edge BioSystem
45 centrifugación a 750 g durante 2 minutos

Análisis:

[0071] Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en secuenciadores ABI3700 o ABI3730.

50

[0072] Los electroferogramas se analizaron para detectar mutaciones mediante programas de análisis disponibles en el comercio, como Sequencher (Gene Codes Corp) y con las herramientas de costumbre.

Ejemplo 5 Respuesta a la dosis

55

[0073] Las construcciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) natural y mutante usadas en este estudio se etiquetaron en el extremo N usando como epítipo la secuencia señal de gD del virus del herpes simple para sustituir a la secuencia señal endógena de EGFR (Schaefer y col., 1999 J Biol Chem 274: 859 – 866). Se sembraron células Cos7 en placas de 12 pocillos en medio de cultivo normal 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con 0,25 µl por pocillo de ADN de los plásmidos de expresión (pRK5.gD.EGFR natural, pRK5.gD.EGFR. L858R o pRK5.gD.EGFR.del(E746-S752)) mediante LipofectAMINE 2000 y de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (Invitrogen). A las 24 horas de la transfección, las células se cultivaron en el medio DMEM sin suero durante seis horas. Una hora antes de la estimulación, las células transfectadas se preincubaron con las concentraciones de erlotinib indicadas. Las células transfectadas se estimularon con TGF-α 1 nM durante 10 minutos. Las células se lisaron directamente en los pocillos con el tampón reductor de Laemmli. La autofosforilación del receptor, un índice de la activación del receptor EGFR por la

60

65

estimulación del factor de crecimiento, se detectó por inmunotransferencia con un anticuerpo dirigido contra fosfotirosina conjugado con HRP (Oncogene Sciences, AB-4). La eficiencia de la transfección se evaluó con un anticuerpo específico del epítipo de gD (5B6). El nivel de activación del receptor se evaluó a partir de los autorradiogramas con el software NIH Image. Estos datos se usaron después para generar una gráfica, a partir de la cual se calculó la CI_{50} mediante una función de ajuste de cuatro parámetros. Según se ilustra en los resultados a continuación, erlotinib tiene mayor afinidad por un EGFR que contiene mutaciones en comparación con el EGFR natural.

	<u>Construcción de EGFR</u>	<u>Inhibición (CI_{50})</u>
10	EGFR natural-gD	50 nM
	L858R EGFR-gD	20 nM
	del(746 – 752) EGFR-gD	5 nM

Listado de secuencias

15

[0074]

< 110 > GENENTECH, INC. KENNETH J. HILLAN

20 < 120 > Mutaciones en EGFR y KRAS

< 130 > 39766-0178PC

< 140 > POR ASIGNAR

25 < 141 > 13-06-2006

< 150 > US 60/695.174

< 151 > 28-06-2006

30 < 160 > 60

< 210 > 1

< 211 > 1.210

< 212 > Proteína

35 < 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 1

Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
1				5					10					15
Ala	Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val
				20					25					30
Cys	Gln	Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu
				35					40					45
Asp	His	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn	Asn	Cys	Glu	Val
				50					55					60
Val	Leu	Gly	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Asp
				65					70					75
Leu	Ser	Phe	Leu	Lys	Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu
				80					85					90
Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Val	Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln
				95					100					105
Ile	Ile	Arg	Gly	Asn	Met	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala
				110					115					120
Val	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn	Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu
				125					130					135
Pro	Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe
				140					145					150
Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val	Glu	Ser	Ile	Gln	Trp	Arg
				155					160					165
Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn	Met	Ser	Met	Asp	Phe
				170					175					180
Gln	Asn	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Pro	Ser	Cys	Pro
				185					190					195
Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys	Gln	Lys	Leu
				200					205					210
Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Ser	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly
				215					220					225
Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys
				230					235					240
Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg
				245					250					255
Asp	Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr
				260					265					270
Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr
				275					280					285
Ser	Phe	Gly	Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val
				290					295					300
Val	Thr	Asp	His	Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser
				305					310					315
Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu
				320					325					330

Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe
				335					340					345
Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys
				350					355					360
Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala
				365					370					375
Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln
				380					385					390
Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu
				395					400					405
Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe
				410					415					420
Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln
				425					430					435
Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu
				440					445					450
Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly
				455					460					465
Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu
				470					475					480
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly
				485					490					495
Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys
				500					505					510
Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser
				515					520					525
Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn
				530					535					540
Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys
				545					550					555
Ile	Gln	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr
				560					565					570
Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr
				575					580					585
Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met
				590					595					600
Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His
				605					610					615
Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly
				620					625					630
Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser
				635					640					645
Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val
				650					655					660
Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met	Arg	Arg	His	Ile	Val		Arg
				665					670					675
Lys	Arg	Thr	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Arg	Glu	Leu	Val	Glu
				680					685					690
Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	Asn	Gln	Ala	Leu	Leu	Arg
				695					700					705
Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ser
				710					715					720
Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly
				725					730					735
Glu	Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala
				740					745					750
Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val
				755					760					765
Met	Ala	Ser	Val	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile
				770					775					780
Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	Met	Pro	Phe
				785					790					795
Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys	Asp	Asn	Ile	Gly
				800					805					810
Ser	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asn	Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	Met
				815					820					825
Asn	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Arg	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala

Arg Asn Val Leu	830	Val Lys Thr Pro Gln	835	His Val Lys Ile Thr	840
Phe Gly Leu Ala	845	Lys Leu Leu Gly Ala	850	Glu Lys Glu Tyr	855
Ala Glu Gly Gly	860	Lys Val Pro Ile Lys	865	Trp Met Ala Leu Glu	870
Ile Leu His Arg	875	Ile Tyr Thr His Gln	880	Ser Asp Val Trp Ser	885
Gly Val Thr Val	890	Trp Glu Leu Met Thr	895	Phe Gly Ser Lys Pro	900
Asp Gly Ile Pro	905	Ala Ser Glu Ile Ser	910	Ser Ile Leu Glu Lys	915
Glu Arg Leu Pro	920	Gln Pro Pro Ile Cys	925	Thr Ile Asp Val Tyr	930
Ile Met Val Lys	935	Cys Trp Met Ile Asp	940	Ala Asp Ser Arg Pro	945
Phe Arg Glu Leu	950	Ile Ile Glu Phe Ser	955	Lys Met Ala Arg Asp	960
Gln Arg Tyr Leu	965	Val Ile Gln Gly Asp	970	Glu Arg Met His Leu	975
Ser Pro Thr Asp	980	Ser Asn Phe Tyr Arg	985	Ala Leu Met Asp Glu	990
Asp Met Asp Asp	995	Val Val Asp Ala Asp	1000	Glu Tyr Leu Ile Pro	1005
Gln Gly Phe Phe	1010	Ser Ser Pro Ser Thr	1015	Ser Arg Thr Pro Leu	1020
Ser Ser Leu Ser	1025	Ala Thr Ser Asn Asn	1030	Ser Thr Val Ala Cys	1035
Asp Arg Asn Gly	1040	Leu Gln Ser Cys Pro	1045	Ile Lys Glu Asp Ser	1050
Leu Gln Arg Tyr	1055	Ser Ser Asp Pro Thr	1060	Gly Ala Leu Thr Glu	1065
Ser Ile Asp Asp	1070	Thr Phe Leu Pro Val	1075	Pro Glu Tyr Ile Asn	1080
Ser Val Pro Lys	1085	Arg Pro Ala Gly Ser	1090	Val Gln Asn Pro Val	1095
His Asn Gln Pro	1100	Leu Asn Pro Ala Pro	1105	Ser Arg Asp Pro His	1110
Gln Asp Pro His	1115	Ser Thr Ala Val Gly	1120	Asn Pro Glu Tyr Leu	1125
Thr Val Gln Pro	1130	Thr Cys Val Asn Ser	1135	Thr Phe Asp Ser Pro	1140
His Trp Ala Gln	1145	Lys Gly Ser His Gln	1150	Ile Ser Leu Asp Asn	1155
Asp Tyr Gln Gln	1160	Asp Phe Phe Pro Lys	1165	Glu Ala Lys Pro Asn	1170
Ile Phe Lys Gly	1175	Ser Thr Ala Glu Asn	1180	Ala Glu Tyr Leu Arg	1185
Ala Pro Gln Ser	1190	Ser Glu Phe Ile Gly	1195	Ala	1200
	1205		1210		

< 210 > 2
 < 211 > 5.616
 5 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*
 < 400 > 2

ES 2 398 709 T3

```

ccccggcgca gcgcggccgc agcagcctcc gccccccgca cgggtgtgagc 50
gcccgacgcg gccgagggcg ccggagtccc gagctagccc cggcggccgc 100
cgccgcccag accggacgac aggccacctc gtcggcgctc gcccgagtcc 150
ccgcctcgcc gccaacgcca caaccaccgc gcaaggcccc ctgactccgt 200
ccagtattga tcgggagagc cggagcgagc tcttcgggga gcagcgatgc 250
gaccctccgg gacggccggg gcagcgctcc tggcgctgct ggctgcgctc 300
tgcccggcga gtcgggctct ggaggaaaag aaagtgtgcc aaggcacgag 350
taacaagctc acgcagttgg gcacttttga agatcatitt ctcagcctcc 400
agaggatgtt caataactgt gaggtggtcc ttgggaattt ggaaattacc 450

```

tatgtgcaga	ggaattatga	tctttccttc	ttaaagacca	tccaggaggt	500
ggctggttat	gtccctcattg	ccctcaacac	agtggagcga	attccttttg	550
aaaacctgca	gatcatcaga	ggaaatatgt	actacgaaaa	ttcctatgcc	600
ttagcagctct	tatctaacta	tgatgcaa	aaaaccggac	tgaaggagct	650
gcccattgaga	aattttacagg	aaatcctgca	tggtcgccgtg	cggttcagca	700
acaaccctgc	cctgtgcaac	gtggagagca	tccagtggcg	ggacatagtc	750
agcagtgaact	ttctcagcaa	catgtcgatg	gacttcagca	accacctggg	800
cagctgccaa	aagtgtgatc	caagctgtcc	caatgggagc	tgctgggggtg	850
caggagagga	gaactgccag	aaactgacca	aaatcatctg	tgcccagcag	900
tgctccgggc	gctgcccgtg	caagtccccc	agtgaactgct	gccacaacca	950
gtgtgctgca	ggctgcacag	gcccccgga	gagcgactgc	ctggtctgcc	1000
gcaaattccg	agacgaagcc	acgtgcaagg	acacctgccc	cccactcatg	1050
ctctacaacc	ccaccacgta	ccagatggat	gtgaacccc	agggcaata	1100
cagcttttgg	gccacctgctg	tgaagaagt	tccccgta	tatgtgtgta	1150
cagatcacgg	ctcgtgctgc	cgagcctgtg	gggcccagac	ctatgagatg	1200
gaggaagacg	gcgtccgcaa	gtgtaagaag	tgcaagggtc	cttgccgcaa	1250
agtgtgtaac	ggaataggtg	ttggtgaatt	taaagactca	ctctccataa	1300
atgtctacgaa	tattaaacac	ttcaaaaact	gcacctccat	cagtggcgat	1350
ctccacatcc	tgccgggtggc	atttaggggt	gactccttca	cacatactcc	1400
tcctcttgat	ccacaggaac	tggatattct	gaaaaccgta	aaggaaatca	1450
caggcttttt	gctgattcag	gcttggcctg	aaaacaggac	ggacctcat	1500
gcttttgaga	acctagaaat	catacgcggc	aggaccaagc	aacatggtca	1550
gttttctctt	gcagtcgtca	gcctgaacat	aacatccttg	ggattacgct	1600
ccctcaaggga	gataagtgat	ggagatgtga	taatttcagg	aaacaaaaat	1650
ttgtgctatg	caaatacaat	aaactggaaa	aaactgtttg	ggacctccgg	1700
tcagaaaacc	aaaattataa	gcaacagagg	tgaaaacagc	tgcaaggcca	1750
caggccaggt	ctgccatgcc	ttgtgctccc	ccgagggctg	ctggggccc	1800
gagcccagg	actgcgtctc	ttgccggaat	gtcagccgag	gcagggaatg	1850
cgtggacaag	tgcaaccttc	tggagggtga	gccaaggag	tttgtggaga	1900
actctgagtg	catacagtg	caccagagt	gcctgcctca	ggccatgaac	1950
atcacctgca	caggacgggg	accagacaac	tgatccagtg	gtgcccacta	2000
cattgacggc	ccccactg	tcaagacctg	cccggcagga	gtcatgggag	2050
aaaacaacac	cctggtctgg	aagtacgcag	acgcccgcga	tgtgtgccac	2100
ctgtgccatc	caaaactgcac	ctacggatgc	actgggccag	gtcttgaagg	2150
ctgtcaaacg	aattggcccta	agatcccgtc	catcgccact	gggatgggtg	2200
gggcccctct	cttgcgtctg	gtggtggccc	tggggatcgg	cctcttcattg	2250
cgaaggcgcc	acatcgcttc	gaagcgacg	ctgcccaggc	tgctgcagga	2300
gagggagctt	gtggagcctc	ttacaccag	tggagaagct	cccaaccaag	2350
ctctcttgag	gatcttgaag	gaaactgaat	tcaaaaagat	caaagtgtctg	2400
ggctccggtg	cgttccggcac	ggtgtataag	ggactctgga	tcccagaagg	2450
tgagaaagt	aaaattcccc	tcgctatcaa	ggaattgaag	gaagcaacat	2500
ctccgaaggc	caacaaggaa	atcctcgatg	aagcctacgt	gatggccagc	2550
gtggacaacc	cccacgtgtg	ccgcctgtctg	ggcatctgcc	tcacctccac	2600
cgtgcagctc	atcacgcagc	tcatgccctt	cggctgcctc	ctggactatg	2650
tccgggaaaca	caaagacaat	attggctccc	agtacctgct	caactggtgt	2700
gtgcagatcg	caaagggcat	gaactacttg	gaggaccgtc	gcttgggtgca	2750
ccgcgacctg	gcagccagga	acgtactggt	gaaaacaccg	cagcatgtca	2800
agatcacaga	ttttgggctg	gccaaactgc	tgggtgcgga	agagaaagaa	2850
taccatgcag	aaggaggcaa	agtgcctatc	aagtggatgg	cattggaatc	2900
aattttacac	agaatctata	cccaccagag	tgatgtctgg	agctacgggg	2950
tgaccgtttg	ggagtgtgat	acctttggat	ccaagccata	tgacggaaatc	3000
cctgccagcg	agatctctc	catcctggag	aaaggagaac	gcctccctca	3050
gccaccata	tgtaccatcg	atgtctacat	gatcatgggtc	aagtgtctgga	3100
tgatagacgc	agatagtgc	ccaaagtccc	gtgagtgtgat	catcgaattc	3150
tccaaaatgg	cccagagacc	ccagcgctac	cttgtcattc	agggggatga	3200
aagaatgcat	ttgccaaagtc	ctacagactc	caacttctac	cgtgccctga	3250
tggatgaaga	agacatggac	gacgtgggtg	atgccgacga	gtacctcatc	3300
ccacagcagg	gcttcttcag	cagcccctcc	acgtcacgga	ctcccctcct	3350
gagctctctg	agtgcacaac	gcaacaattc	caecgtggct	tgcatgtgata	3400
gaaatgggct	gcaaagctgt	cccatcaagg	aagacagctt	cttgacgagca	3450
tacagctcag	acccacacag	cgccttgact	gaggacagca	tagacgacac	3500
cttctcccca	gtgcctgaat	acataaacca	gtccgttccc	aaaaggccc	3550
ctggctctgt	gcagaatcct	gtctatcaca	atcagcctct	gaaccccgcg	3600
cccagcagag	acccacacta	ccaggacccc	cacagcactg	cagtgggcaa	3650
ccccgagtat	ctcaacactg	tccagcccac	ctgtgtcaac	agcattctcg	3700
acagccctgc	ccactgggccc	cagaaaggca	gccaccaaat	tagcctggag	3750
aaccctgact	accagcagga	cttctttccc	aaggaaagcca	agccaaatgg	3800

catctttaag	ggctccacag	ctgaaaatgc	agaataccta	agggctcgcg	3850
cacaaagcag	tgaatttatt	ggagcatgac	cacggaggat	agtatgagcc	3900
ctaaaaatcc	agactctttc	gatacccagg	accaagccac	agcaggctct	3950
ccatcccaac	agccatgccc	gcatttagct	ttagaccacac	agactgggtt	4000
tgcaacggtt	acaccgacta	gccaggaaat	acttccacct	cgggcacatt	4050
tggggaagtt	gcattctttt	gtcttcaaat	tgtgaagcat	ttacagaac	4100
gcattccagca	agaaatattgt	cccttttgagc	agaaatttat	ctttcaaaaga	4150
ggtatatttg	aaaaaaaaaa	aaagtatatg	tgaggatttt	tattgattgg	4200
ggatcttgga	gtttttcatt	gtcgtatttg	atttttactt	caatgggctc	4250
ttccaacaag	gaagaagctt	gctggtagca	cttgctaccc	tgagttcatc	4300
caggcccaac	tgtgagcaag	gagcacaagc	cacaagtctt	ccaggaggatg	4350
cttgattcca	gtggtttctg	ttcaaggctt	ccactgcaaa	acactaaaga	4400
tccaagaagg	cttctatggc	cccagcaggc	cggatcggtg	ctgtatcaag	4450
tcatggcagg	tacagtagga	taagccactc	tgtcccttcc	tgggcaaaaga	4500
agaaacggag	gggatggaat	tcttccttag	acttactttt	gtaaaaatgt	4550
ccccacggta	cttactcccc	actgatggac	cagtgggttc	cagtcatgag	4600
cgttagactg	acttggtttg	cttccattcc	attgttttga	aactcagtat	4650
gctgccccgt	tcttgctgtc	atgaaatcag	caagagagga	tgacacatca	4700
ataataaact	cggatgtccag	cccacattgg	attcatcagc	atttggacca	4750
atagccca	gctgagaatg	tggaatacct	aaggatagca	ccgcttttgt	4800
tctcgcaaaa	acgtatctcc	taatttgagg	ctcagatgaa	atgcattcagg	4850
tcctttgggg	catagatcag	aagactacaa	aaatgaagct	gctctgaaat	4900
ctcctttagc	catcacccca	accccccaaa	attagtttgt	gttacttatg	4950
gaagatagtt	ttctcctttt	acttcacttc	aaaagctttt	tactcaaaaga	5000
gtatatgttc	ctccagggtc	agctgcccc	aaaccccttc	cttaccgttt	5050
gtcacacaaa	aagtgtctct	gccttgagtc	atctattcaa	gcacttacag	5100
ctctggccac	aacagggcat	tttacagggtg	cgaatgacag	tagcatttatg	5150
agtagtgtag	aattcagggtg	gtaaatatga	aactagggtt	tgaaattgat	5200
aatgctttca	caaccttttg	agatgtttta	gaaggaaaaa	agttccttcc	5250
taaaataatt	ttctatacat	tggaagattg	gaagattcag	ctagtttaga	5300
gccacacatt	tttcttaaat	tgtgtgtgct	ctgtaacctg	actggttaac	5350
agcagtcctt	tgtaaacagt	gttttaaaact	ctcctagtca	atatccaccc	5400
catccaattt	atcaaggaag	aaatgggtca	gaaaatattt	tcagcctaca	5450
gttatgttca	gtcacacaca	catacaaaat	gttccttttg	cttttaaggt	5500
aatttttgac	tccagatcca	gtcagagccc	ctacagcatt	gttaagaaag	5550
tatttgattt	ttgtctcaat	gaaaataaaa	ctatatccat	ttccactcta	5600
aaaaaaaaaa	aaaaaa	5616			

< 210 > 3
< 211 > 6
< 212 > Proteína
< 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 3

Lys Val Leu Gly Ser Gly
1 5

10

< 210 > 4
< 211 > 18
< 212 > ADN

15 < 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 4
aaagtgtctgg gctccgg

20 < 210 > 5
< 211 > 18
< 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

25 < 400 > 5
aaagtgtctgt gctccgg

< 210 > 6
< 211 > 6

ES 2 398 709 T3

< 212 > Proteína
< 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 6

5

Lys Val Leu Ala Ser Gly
1 5

< 210 > 7
< 211 > 18
< 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

10

< 400 > 7
aaagtgcctgg cctccgt

18

15

< 210 > 8
< 211 > 6
< 212 > Proteína
< 213 > *Homo sapiens*
< 400 > 8

20

Lys Val Leu Cys Ser Gly
1 5

< 210 > 9
< 211 > 19
< 212 > Proteína
< 213 > *Homo sapiens*

25

< 400 > 9

30

Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys
1 5 10 15
Glu Ile Leu Asp

< 210 > 10
< 211 > 57
< 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

35

< 400 > 10

gctatcaagg aattaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50
cctcgat 57

40

< 210 > 11
< 211 > 42
< 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

45

< 400 > 11
gctatcaaaa catctccgaa agccaacaag gaaatcctcg at

42

50

< 210 > 12
< 211 > 48
< 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

55

< 400 > 12
gctatcaagc aaccaacatc tccgaaagcc aacaaggaaa tcctcgat

48

ES 2 398 709 T3

< 210 > 13
 < 211 > 39
 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*
 5 < 400 > 13
 gctatcaagg aatcgaaagc caacaaggaa atcctcgat 39
 < 210 > 14
 10 < 211 > 33
 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*
 < 400 > 14
 15 gctatcaagg aattaagaga agcaaccctc gat 33
 < 210 > 15
 < 211 > 57
 < 212 > ADN
 20 < 213 > *Homo sapiens*
 < 400 > 15
 gctatcaagg aattaagaga agcaacatct ccgaaagtca acaaggaaat 50
 cctcgat 57
 25 < 210 > 16
 < 211 > 57
 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*
 30 < 400 > 16
 gctatcaagg aatcaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50
 cctcgat 57
 35 < 210 > 17
 < 211 > 57
 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*
 40 < 400 > 17
 gctatcaaga aattaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50
 cctcgat 57
 < 210 > 18
 45 < 211 > 7
 < 212 > Proteína
 < 213 > *Homo sapiens*
 < 400 > 18
 50 Met Ala Ser Val Asp Asn Pro
 1 5
 < 210 > 19
 < 211 > 21
 55 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*
 < 400 > 19
 atggccagcg tggacaacc c 21

< 210 > 20
 < 211 > 27
 < 212 > ADN
 5 < 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 20
 atggccatag ccagcgtgga caacccc 27

10 < 210 > 21
 < 211 > 9
 < 212 > Proteína
 < 213 > *Homo sapiens*

15 < 400 > 21

Met Ala Ile Ala Ser Val Asp Asn Pro
 1 5

< 210 > 22
 20 < 211 > 30
 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 22
 25 atggccagcg tggccagcgt ggataacccc 30

< 210 > 23
 < 211 > 10
 < 212 > Proteína
 30 < 213 > *Homo sapiens*
 < 400 > 23

Met Ala Ser Val Ala Ser Val Asp Asn Pro
 1 5 10

35 < 210 > 24
 < 211 > 21
 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*

40 < 400 > 24
 atggccatcg tggacaacc c 21

< 210 > 25
 45 < 211 >
 < 212 > Proteína
 < 213 > *Homo sapiens*
 < 400 > 25

50

Met Ala Ile Val Asp Asn Pro
 1 5

< 210 > 26
 < 211 > 6
 55 < 212 > Proteína
 < 213 > *Homo sapiens*
 < 400 > 26

Phe Gly Leu Ala Lys Leu
1 5

< 210 > 27
< 211 > 18
5 < 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 27
10 ttgggctgg ccaaactg 18

< 210 > 28
< 211 > 18
< 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

15 < 400 > 28
ttgggcggg ccaaactg 18

< 210 > 29
20 < 211 > 6
< 212 > Proteína
< 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 29
25

Phe Gly Arg Ala Lys Leu

1 5

< 210 > 30
< 211 > 18
30 < 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

< 400 > 30
35 ttgggccgg ccaaactg 18

< 210 > 31
< 211 > 6
< 212 > Proteína
< 213 > *Homo sapiens*

40 < 400 > 31

Phe Gly Pro Ala Lys Leu
1 5

45 < 210 > 32
< 211 > 10
< 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

50 < 400 > 32
ggaattaaga 10

< 210 > 33
< 211 > 15
55 < 212 > ADN
< 213 > *Homo sapiens*

	< 400 > 33		
	ggaattaaga gaagc	15	
	< 210 > 34		
5	< 211 > 18		
	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 34		
10	taagagaagc aacatctc	18	
	< 210 > 35		
	< 211 > 18		
	< 212 > ADN		
15	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 35		
	ttaagagaag caacatct	18	
20	< 210 > 36		
	< 211 > 12		
	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
25	< 400 > 36		
	taagagaagc aa	12	
	< 210 > 37		
	< 211 > 24		
30	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 37		
35	atctccgaaa gccacaagg aaat	24	
	< 210 > 38		
	< 211 > 19		
	< 212 > Proteina		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
40	< 400 > 38		
	Lys Lys Lys Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly		
	1 5 10 15		
	Trp Leu Asp Phe		
45	< 210 > 39		
	< 211 > 25		
	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
50	< 400 > 39		
	caaatgagct ggcaagtgcc gtgtc	25	
	< 210 > 40		
	< 211 > 25		
55	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 40		
60	gagtttccca aacactcagt gaaac	25	
	< 210 > 41		
	< 211 > 25		
	< 212 > ADN		

	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	
	< 400 > 41	
5	gcaatatcag ccttaggtgc ggctc	25
	< 210 > 42	
	< 211 > 26	
	< 212 > ADN	
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	
10	< 400 > 42	
	catagaaagt gaacatttag gatgtg	26
	< 210 > 43	
15	< 211 > 24	
	< 212 > ADN	
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	
	< 400 > 43	
20	ccatgagtac gtatttgaa actc	24
	< 210 > 44	
	< 211 > 24	
	< 212 > ADN	
25	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	
	< 400 > 44	
	catatcccca tggcaaactc ttgc	24
30	< 210 > 45	
	< 211 > 24	
	< 212 > ADN	
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	
35	< 400 > 45	
	ctaacgttcg ccagccataa gtcc	24
	< 210 > 46	
	< 211 > 26	
40	< 212 > ADN	
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	
	< 400 > 46	
45	gctgcgagct caccagaat gtctgg	26
	< 210 > 47	
	< 211 > 44	
	< 212 > ADN	
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	
50	< 400 > 47	
	tgtaaaacga cggccagtca agtgccgtgt cctggcacc aagc	44
	< 210 > 48	
55	< 211 > 42	
	< 212 > ADN	
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	
	< 400 > 48	
60	caggaaacag ctatgacccc aaacactcag tgaacaaag ag	42
	< 210 > 49	
	< 211 > 39	
	< 212 > ADN	
65	< 213 > <i>Homo sapiens</i>	

	< 400 > 49		
	tgtaaaacga cggccagtcc ttaggtgcgg ctccacagc	39	
	< 210 > 50		
5	< 211 > 40		
	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 50		
10	caggaaacag ctatgaccca ttaggatgt ggagatgagc	40	
	< 210 > 51		
	< 211 > 41		
	< 212 > ADN		
15	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 51		
	tgtaaaacga cggccagtga aactcaagat cgcattcatg c	41	
20	< 210 > 52		
	< 211 > 41		
	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
25	< 400 > 52		
	caggaaacag ctatgaccgc aaactcttgc tatcccagga g	41	
	< 210 > 53		
	< 211 > 40		
30	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 53		
	-tgtaaaacga-cggccagtca gccataagtc ctgcacgtgg	40	
35	< 210 > 54		
	< 211 > 42		
	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
40	< 400 > 54		
	caggaaacag ctatgaccca tcctcccctg catgtgttaa ac	42	
	< 210 > 55		
45	< 211 > 23		
	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 55		
50	tactggtgga gtatttgata gtg	23	
	< 210 > 56		
	< 211 > 21		
	< 212 > ADN		
55	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
	< 400 > 56		
	ctgtatcaaa gaatggtcct g	21	
60	< 210 > 57		
	< 211 > 38		
	< 212 > ADN		
	< 213 > <i>Homo sapiens</i>		
65	< 400 > 57		
	tgtaaaacga cggccagtta gtgtattaac cttatgtg	38	

< 210 > 58
 < 211 > 42
 < 212 > ADN
 5 < 213 > *Homo sapiens*

 < 400 > 58
 caggaaacag ctatgaccac ctctattggt ggatcatatt cg 42

 10 < 210 > 59
 < 211 > 18
 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*

 15 < 400 > 59
 tgtaaaacga cggccagt 18

 < 210 > 60
 < 211 > 18
 20 < 212 > ADN
 < 213 > *Homo sapiens*

 < 400 > 60
 caggaaacag ctatgacc 18

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la identificación de un paciente que no es sensible al tratamiento con un inhibidor de EGFR en combinación con un agente quimioterapéutico, que comprende la determinación *in vitro* de la presencia o ausencia de una mutación en KRAS y de EGFR natural o mutado en un tumor de dicho paciente, según lo cual, la presencia simultánea de una mutación en KRAS y de EGFR en dicho tumor indica que el paciente no responderá a dicho tratamiento con un inhibidor de EGFR en combinación con quimioterapia.
2. Procedimiento para determinar si un tumor responderá al tratamiento con un inhibidor de EGFR en combinación con un agente quimioterapéutico, que comprende la determinación de la presencia de EGFR natural o mutado y un KRAS mutante en una muestra de dicho tumor, según lo cual, la presencia simultánea de EGFR y una proteína o gen KRAS mutantes indica que el tumor no responderá al tratamiento con un inhibidor de EGFR.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en que dicha mutación en KRAS es una mutación activadora.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en que dicha mutación en KRAS es al menos una de entre G12C, G12A, G12D, G12R, G12S, G12V, G13C y G13D.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicho inhibidor de EGFR es uno o más de entre cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en que dicho inhibidor de EGFR es erlotinib.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicho agente quimioterapéutico es uno o más de entre citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, bleomicina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, mitoxantrona, camptotecina, topotecán, tenipósido, colcemida, colchicina, paclitaxel, vinblastina, vincristina o tamoxifeno.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho agente quimioterapéutico es carboplatino y/o paclitaxel.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el EGFR es EGFR natural.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el EGFR es EGFR mutado.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la presencia de EGFR se determina por inmunohistoquímica.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la presencia de una mutación en KRAS se determina mediante la amplificación de un ácido nucleico de KRAS a partir de dicho tumor o de un fragmento del mismo, del que se sospecha que contiene una mutación, y la secuenciación de dicho ácido nucleico amplificado.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la presencia de una mutación en KRAS se determina mediante la amplificación de un ácido nucleico de KRAS a partir de dicho tumor o de un fragmento del mismo, del que se sospecha que contiene una mutación, y la comparación de la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del correspondiente ácido nucleico o fragmento de KRAS natural.
14. Procedimiento según la reivindicación 1 o según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, como dependientes de ésta, en el que la presencia simultánea de una mutación en KRAS y de EGFR indica que se espera una menor supervivencia para el paciente si se le trata con un inhibidor de EGFR en combinación con quimioterapia que si se le trata solamente con quimioterapia.
15. Inhibidor de EGFR para uso en un procedimiento para el tratamiento de un tumor en combinación con quimioterapia, en el que el tratamiento está contraindicado para tumores que contienen simultáneamente una

mutación en KRAS y EGFR.

16. Inhibidor de EGFR para uso en un procedimiento para el tratamiento de un tumor en combinación con quimioterapia de acuerdo con la reivindicación 15, que es uno o más de entre cetuximab, panitumumab, erlotinib o
5 gefitinib.

17. Inhibidor de EGFR para uso en un procedimiento para el tratamiento de un tumor en combinación con quimioterapia de acuerdo con la reivindicación 16, que es erlotinib.

1 MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRALEEKV CQGTSNKLTQ LGTFEDHFLS
 51 LQRMFNNCEV VLGNEITYV QRNYDLSFLK TIQEVAGYVL IALNTVERIP
 101 LENLQIIRGN MYYENSYALA VLSNYDANKT GLKELPMRNL QEILHGAVRF
 151 SNNPALCNVE SIQWRDIVSS DFLSNMSMDF QNHLGSCQKC DPSCPNGSCW
 201 GAGEENCQKL TKIICAQQCS GRCRGKSPSD CCHNQCAAGC TGPRESDECLV
 251 CRKFRDEATC KDTCPPLMLY NPTTYQMDVN PEGKYSFGAT CVKKCPRNYV
 301 VTDHGSCVRA CGADSYEMEE DGVRKCKKCE GPCRKVCNGI GIGEFKDSLS
 351 INATNIKHFK NCTSIGDLH ILPVAFRGDS FTHTPPLDPQ ELDILKTVE
 401 ITGFLLIQAW PENRTDLHAF ENLEIIRGRT KQHGQFSLAV VSLNITSGL
 451 RSLKEISDGD VIISGNKNLC YANTINWKKL FGTSGQKTKI ISNRGENSCK
 501 ATGQVCHALC SPEGCWGPEP RDCVSCRNVS RGRECVDKCN LLEGEPRFV
 551 ENSECIQCHP ECLPQAMNIT CTGRGPDNCI QCAHYIDGPH CVKTCFAGVM
 601 GENNTLVWKY ADAGHVCHLC HPNCTYGCTG PGLEGCPNG PKIPSIATGM
 651 VGALLLLLVV ALGIGLFMRR RHIVRKRTL RLLQERELVE PLTPSGEAPN
 701 QALLRILKET EFKKIKVLGS GAFGTVYKGL WIPEGEKVKI PVAIKELREA
 751 TSPKANKEIL DEAYVMASVD NPHVCRLGI CLTSTVQLIT QLMFPGCLLD
 801 YVREHKDNIG SQYLLNWCVQ IAKGMNYLED RRLVHRDLAA RNVLVKTPQH
 851 VKITDFGLAK LLGAEEKEYH AEGGKVPIKW MALESILHRI YTHQSDVWSY
 901 GVTWELMTF GSKPYDGIPA SEISSILEKG ERLPQPPICT IDVYMIMVKC
 951 WMIDADSRPK FRELIIEFSK MARDPQRYLV IQGDERMHL PPTDSNFYRA
 1001 LMDEEDMDDV VDADEYLIPQ QGFFSSPSTS RTPLLSSLSA TSNNSTVACI
 1051 DRNGLQSCPI KEDSFLQRY S DPTGALTED SIDDFTFLPVP EYINQSVPKR
 1101 PAGSVQNPVY HNQPLNPAPS RDPHYQDPHS TAVGNPEYLN TVQPTCVNST
 1151 FDSPAHWQK GSHQISLDNP DYQQDFFPKE AKPNGIFKGS TAENAEYLRV
 1201 APQSSEFIGA

Figura 1

CCCCGGCGCAGCGCGGCCGCAGCAGCCTCCGCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGACGCG	60
GGCGAGGCGGCGCGGAGTCCCGAGCTAGCCCCGGCGGCGCGCGCGCGCCCGAGACCGGACGAC	120
AGGCCACCTCGTCGGCGTCCGCCCCGAGTCCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGC	180
GCACGGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCTCTTCGGGGA	240
GCAGCGATGCGACCCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTC	300
TGCCCCGGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTC	360
ACGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCATTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGT	420
GAGGTGCTCCTTGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTC	480
TTAAAGACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGA	540
ATTCTTTTGGAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCTATGCC	600
TTAGCAGTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAACCGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGA	660
AATTTACAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTTTCAGCAACAACCCTGCCCCTGTGCAAC	720
GTGGAGAGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTCGATG	780
GACTTCCAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGC	840
TGCTGGGGTGACAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAAATCATCTGTGCCCAGCAG	900
TGCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCA	960
GGCTGCACAGGCCCCCGGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCAGAGACGAAGCC	1020
ACGTGCAAGGACACCTGCCCCCACTCATGCTCTACAACCCACACGTACCAGATGGAT	1080
GTGAACCCCGAGGGCAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCCGTAAT	1140
TATGTGGTGACAGATCACGGCTCGTGCGTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATG	1200
GAGGAAGACGGCGTCCGCAAGTGTAAGAAGTGCGAAGGGCCTTGCCGCAAAGTGTGTAAC	1260
GGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACAC	1320
TTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGT	1380

Figura 2a

GACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAAC TGGATATTCTGAAAACCGTA	1440
AAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATT CAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCAT	1500
GCCTTTGAGAACCTAGAAATCATA CGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTT	1560
GCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGAT	1620
GGAGATGTGATAATTT CAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAA	1680
AAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGC	1740
TGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCCG	1800
GAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAG	1860
TGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGC	1920
CACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAAC	1980
TGTATCCAGTGTGCCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA	2040
GT CATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCAC	2100
CTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACG	2160
AATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTG	2220
GTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTTCGGAAGCGCACG	2280
CTGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCT	2340
CCCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTGCTG	2400
GGCTCCGGTGCGTTCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTT	2460
AAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAA	2520
ATCCTCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCTGCTG	2580
GGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTC	2640
CTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCAGTACCTGCTCAACTGGTGT	2700

Figura 2b

GTGCAGATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTG	2760
GCAGCCAGGAACGTACTGGTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTG	2820
GCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATC	2880
AAGTGGATGGCATTTGGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGATGTCTGG	2940
AGCTACGGGGTGACCGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGAATC	3000
CCTGCCAGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAAGGAGAACGCCTCCCTCAGCCACCCATA	3060
TGTACCATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGCTGGATGATAGACGCAGATAGTCGC	3120
CCAAAGTTCGGTGAGTTGATCATCGAATTCTCCAAAATGGCCCGAGACCCCCAGCGCTAC	3180
CTTGTCAATTCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCCTACAGACTCCAACCTCTAC	3240
CGTGCCCTGATGGATGAAGAAGACATGGACGACGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATC	3300
CCACAGCAGGGCTTCTTCAGCAGCCCCCTCCACGTCACGGACTCCCCCTCCTGAGCTCTCTG	3360
AGTGCAACCAGCAACAATTCACCGTGGCTTGCAATTGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGT	3420
CCCATCAAGGAAGACAGCTTCTTGACGCGATACAGCTCAGACCCACAGGCGCCTTGACT	3480
GAGGACAGCATAGACGACACCTTCCTCCAGTGCCTGAATACATAAACCAGTCCGTTCCTC	3540
AAAAGGCCCGCTGGCTCTGTGCAGAATCCTGTCTATCACAATCAGCCTCTGAACCCCGCG	3600
CCCAGCAGAGACCCACACTACCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTAT	3660
CTCAACACTGTCCAGCCCACCTGTGTCAACAGCACATTCGACAGCCCTGCCCACTGGGGCC	3720
CAGAAAGGCAGCCACCAAATTAGCCTGGACAACCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCC	3780
AAGGAAGCCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTA	3840
AGGGTCGCGCCACAAAGCAGTGAATTTATTGGAGCATGACCACGGAGGATAGTATGAGCC	3900
CTAAAAATCCAGACTCTTTCGATACCCAGGACCAAGCCACAGCAGGTCCTCCATCCCAAC	3960
AGCCATGCCCCCATTAGCTCTTAGACCCACAGACTGGTTTTGCAACGTTTACACCGACTA	4020
GCCAGGAAGTACTTCCACCTCGGGCACATTTTGGGAAGTTGCATTCTTTGTCTTCAAAC	4080
TGTGAAGCATTTACAGAAACGCATCCAGCAAGAATATTGTCCCTTTGAGCAGAAATTTAT	4140

Figura 2c

CTTTCAAAGAGGTATATTTGAAAAAAAAAAAAAGTATATGTGAGGATTTTTATTGATTGG	4200
GGATCTTGGAGTTTTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAG	4260
GAAGAAGCTTGCTGGTAGCACTTGCTACCCCTGAGTTCATCCAGGCCCAACTGTGAGCAAG	4320
GAGCACAAAGCCACAAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCCAGTGGTTCTGCTTCAAGGCTT	4380
CCACTGCAAAACACTAAAGATCCAAGAAGGCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTA	4440
CTGTATCAAGTCATGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGA	4500
AGAAACGGAGGGGATGGAATCTTCCTTAGACTTACTTTGTAAAAATGTCCCCACGGTA	4560
CTTACTCCCCACTGATGGACCAGTGGTTTCCAGTCATGAGCGTTAGACTGACTTGTTTGT	4620
CTTCCATTCCATTGTTTTGAAACTCAGTATGCTGCCCCCTGTCTTGCTGTCATGAAATCAG	4680
CAAGAGAGGATGACACATCAAATAATAACTCGGATTCCAGCCCACATTGGATTTCATCAGC	4740
ATTTGGACCAATAGCCACAGCTGAGAATGTGGAATACCTAAGGATAGCACCGCTTTTGT	4800
TCTCGCAAAAACGTATCTCCTAATTTGAGGCTCAGATGAAATGCATCAGGTCCTTTGGGG	4860
CATAGATCAGAAGACTACAAAAATGAAGCTGCTCTGAAATCTCCTTTAGCCATCACCCCA	4920
ACCCCCCAAATTAGTTTGTGTTACTTATGGAAGATAGTTTTCTCCTTTTACTTCAC TTC	4980
AAAAGCTTTTTACTCAAAGAGTATATGTTCCCTCCAGGTCAGCTGCCCCCAAACCCCTC	5040
CTTACGCTTTGTACACAAAAAGTGTCTCTGCCTTGAGTCATCTATTCAAGCACTTACAG	5100
CTCTGGCCACAACAGGGCATTTTACAGGTGCGAATGACAGTAGCATTATGAGTAGTGTGG	5160
AATTCAGGTAGTAAATATGAAACTAGGGTTTGAAATTGATAATGCTTTCACAACATTTGC	5220
AGATGTTTTAGAAGGAAAAAAGTTCCTTCCTAAATAATTTCTCTACAATTGGAAGATTG	5280
GAAGATTCACTAGTTAGGAGCCACCTTTTTTCTAATCTGTGTGTGCCCTGTAACTTG	5340
ACTGGTTAACAGCAGTCCTTTGTAAACAGTGTTTTAAACTCTCCTAGTCAATATCCACCC	5400
CATCCAATTTATCAAGGAAGAAATGGTTTCAGAAAATATTTTCAGCCTACAGTTATGTTCA	5460
GTCACACACACATACAAAATGTTCCCTTTTGCTTTTAAAGTAATTTTGACTCCCAGATCA	5520
GTCAGAGCCCCTACAGCATTGTTAAGAAAGTATTTGATTTTTGTCTCAATGAAAATAAAA	5580
CTATATTCAATTCCTACTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

Figura 2d

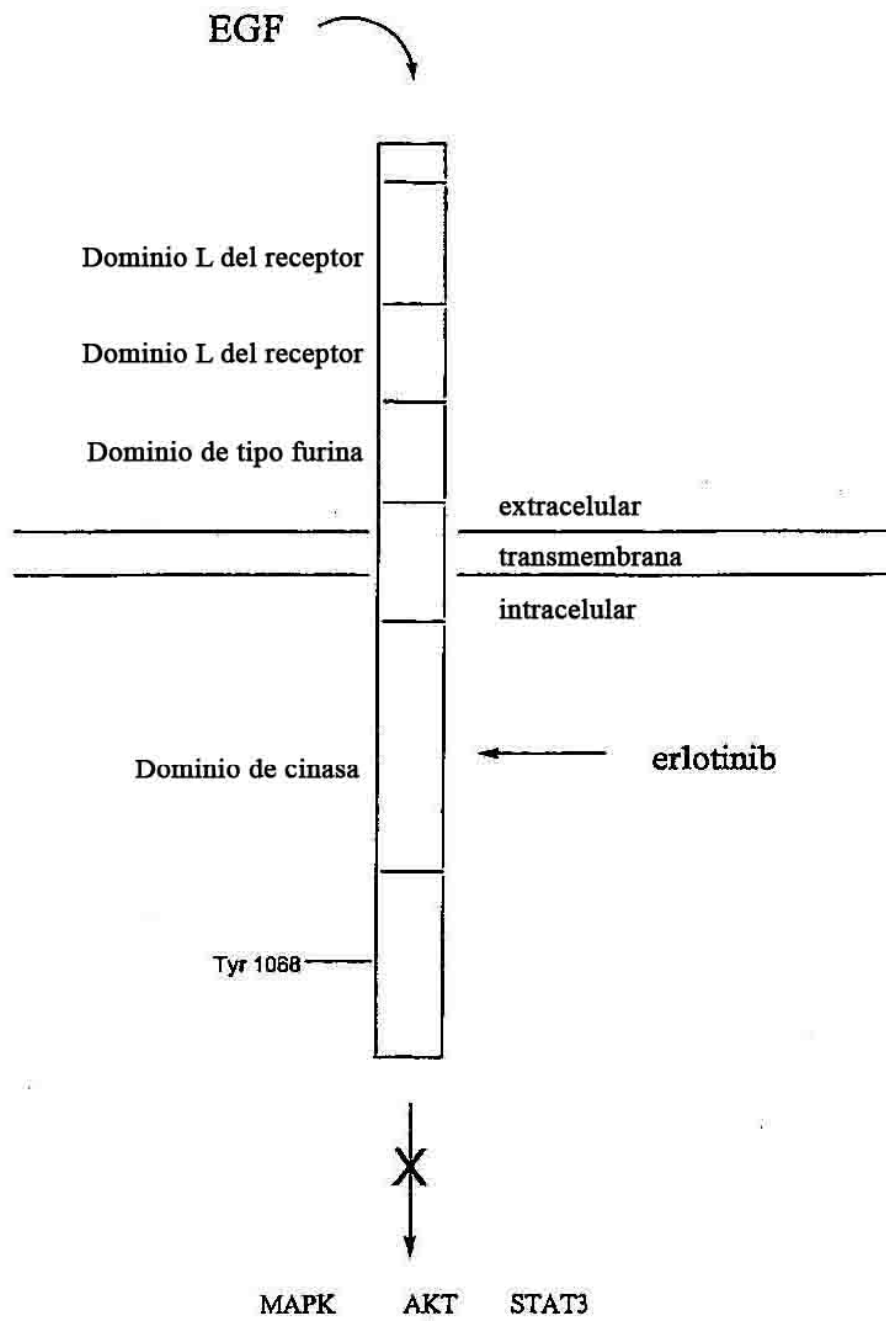


Figura 3

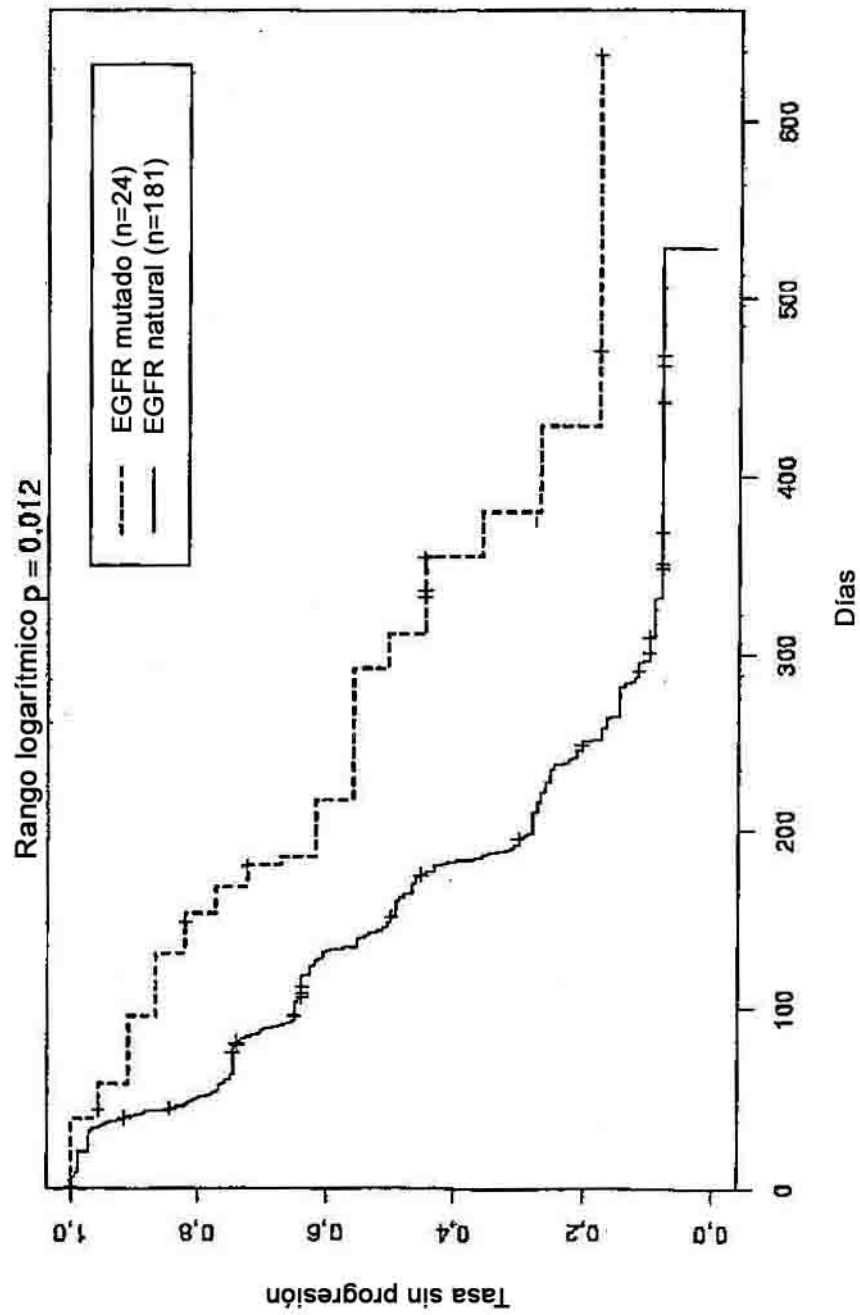


Figura 4

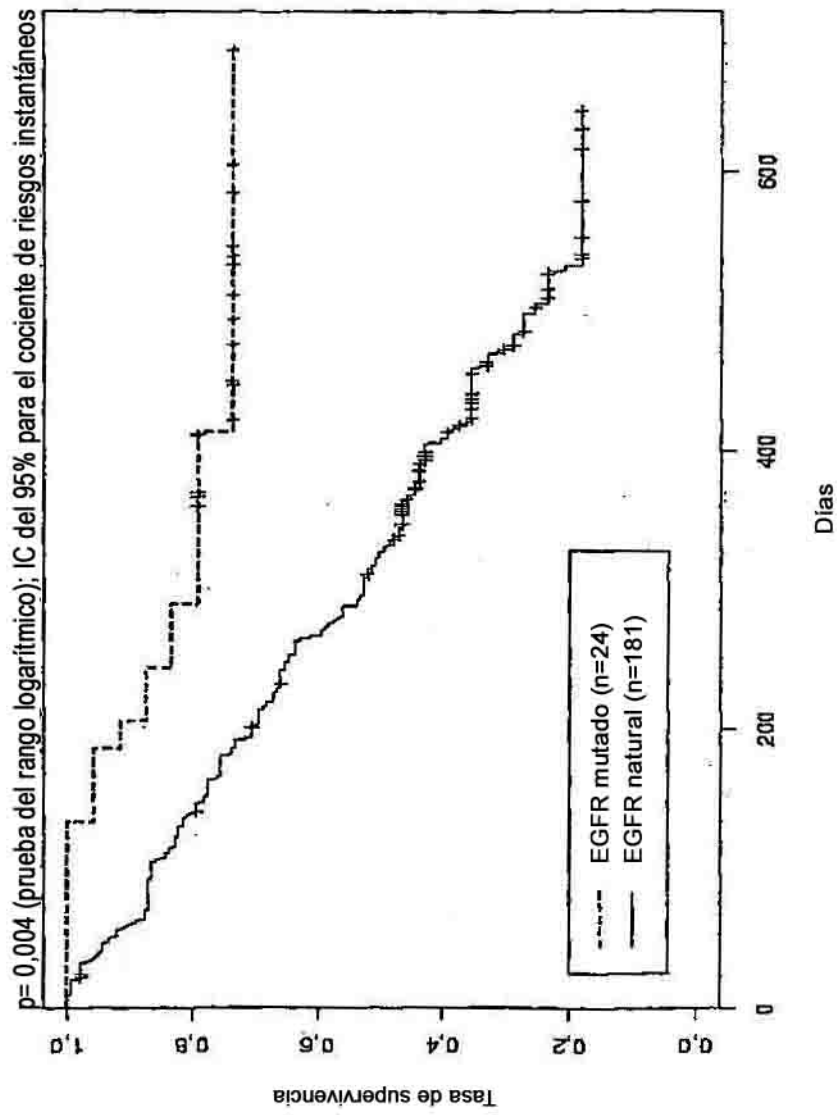


Figura 5

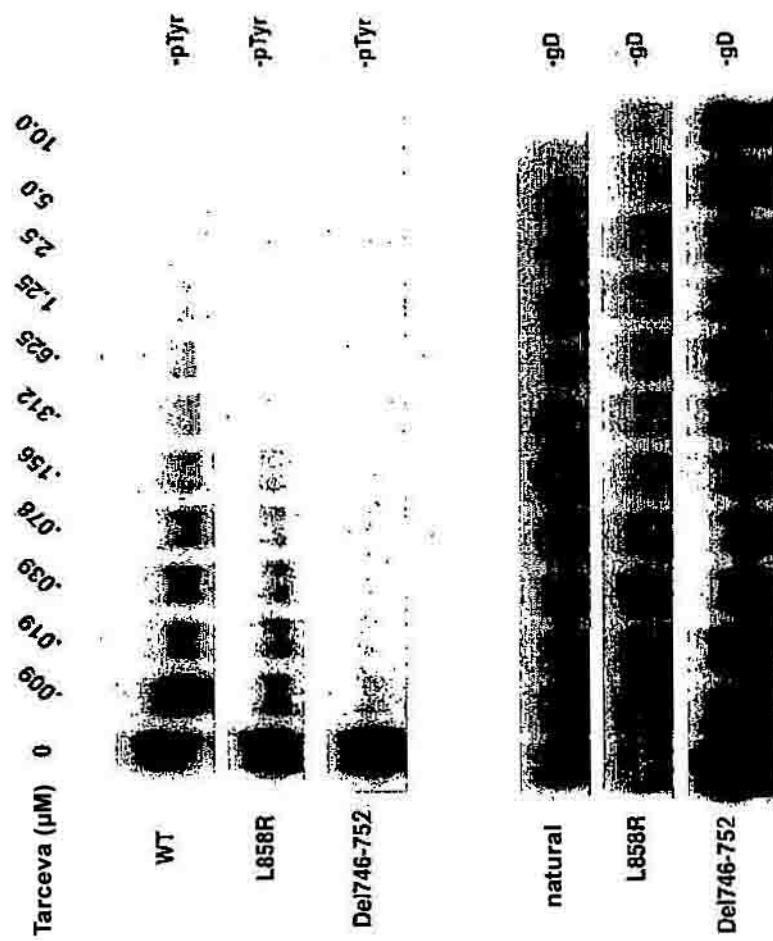


Figura 6

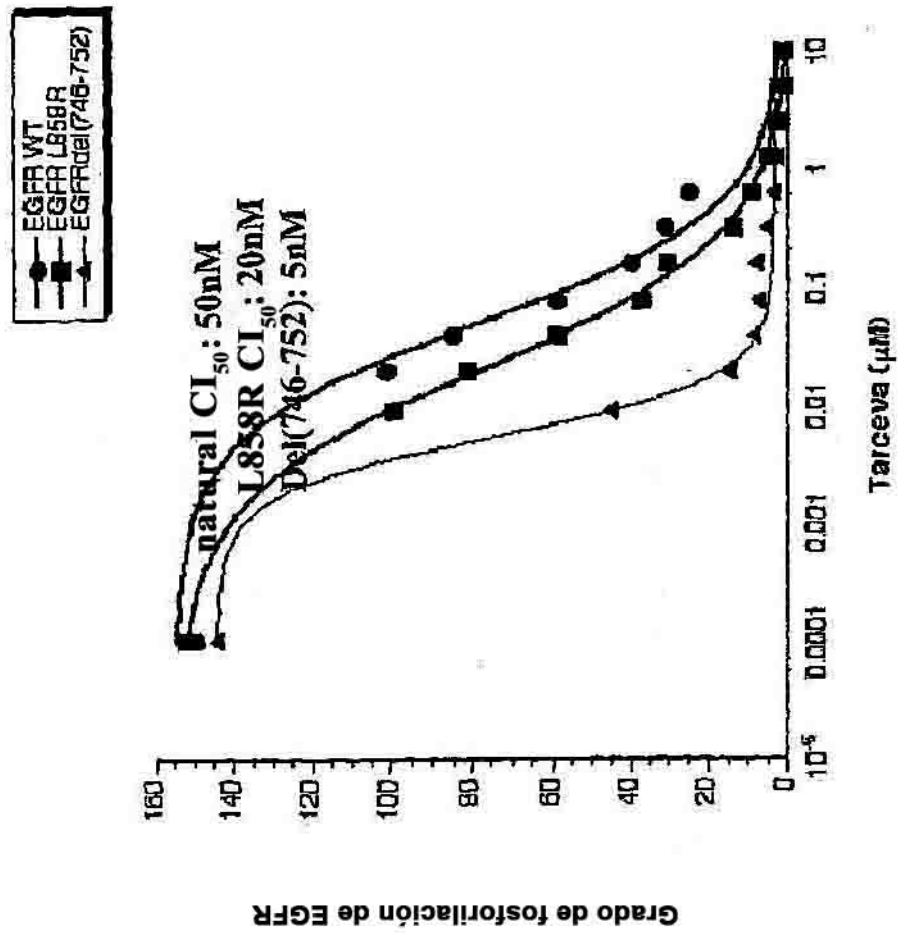


Figura 7

EXÓN 18

Proteína EGFR	716	K V L G S G (SEQ ID NO: 3)
Gen EGFR	2392	AAAGTGGTGGCTCCGGT (SEQ ID NO: 4)
M1 (G719A)		AAAGTGTGTGCTCCGGT {KVLASG} (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 6)
M2 (G719C)		AAAGTGTGGCTCCGGT {KVLCSG} (SEQ ID NO: 7) (SEQ ID NO: 8)

EXÓN 19

Proteína EGFR	743	A I K E L R E A T S P K A N K E I L D (SEQ ID NO: 9)
Gen EGFR	2473	GCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAATCCTCGAT (SEQ ID NO: 10)
M3 (E746-A750del)		GCTATCAA-----AACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAATCCTCGAT (SEQ ID NO: 11)
M4 (E748-R748del E749Q A750P)		GCTATCAAG-----CAACCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAATCCTCGAT (SEQ ID NO: 12)
M5 (L747S R748-P753del)		GCTATCAAGGAAT-----CGAAAGCCAAACAAGGAATCCTCGAT (SEQ ID NO: 13)
M6 (S752-I759del)		GCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAAC-----CCTCGAT (SEQ ID NO: 14)
M11 (A755V)		GCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGTCAACAAGGAATCCTCGAT (SEQ ID NO: 15)
M12 (L747S)		GCTATCAAGGAATCAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAATCCTCGAT (SEQ ID NO: 16)
M13 (E746K)		GCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAATCCTCGAT (SEQ ID NO: 17)

Figura 8

EXÓN 20

Proteína EGFR					
Gen EGFR					
	766				
	2542				
		M A	S V D N P	(SEQ ID NO: 18)	
		ATGGCC	-----AGCGTGGACAACCCC	(SEQ ID NO: 19)	
M7 (M766-A767 AI ins)					
		ATGGCCATA	---GCCAGCGTGGACAACCCC	{MAIASVDNP}	
			(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 21)	
M8 (S768-V769 SVA ins)					
		ATGGCCAGCGTGGCCAGCGTGGATAACCCC		{MASVASVDNP}	
			(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 23)	
M9 (S768I)					
		ATGGCC	-----ATCGTGGACAACCCC	{MAIVDNP}	
			(SEQ ID NO: 24)	(SEQ ID NO: 25)	

EXÓN 21

Proteína EGFR					
Gen EGFR					
	856				
	2812				
		F G L A K L	(SEQ ID NO: 26)		
		TTTGGGCTGGCCAAACTG	(SEQ ID NO: 27)		
M10 (L858R)					
		TTTGGGCGGGCCAAACTG	{FGRAKL}		
			(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 29)	
M14 (L858P)					
		TTTGGGCGGGCCAAACTG	{FGPAKL}		
			(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 31)	

Figura 9

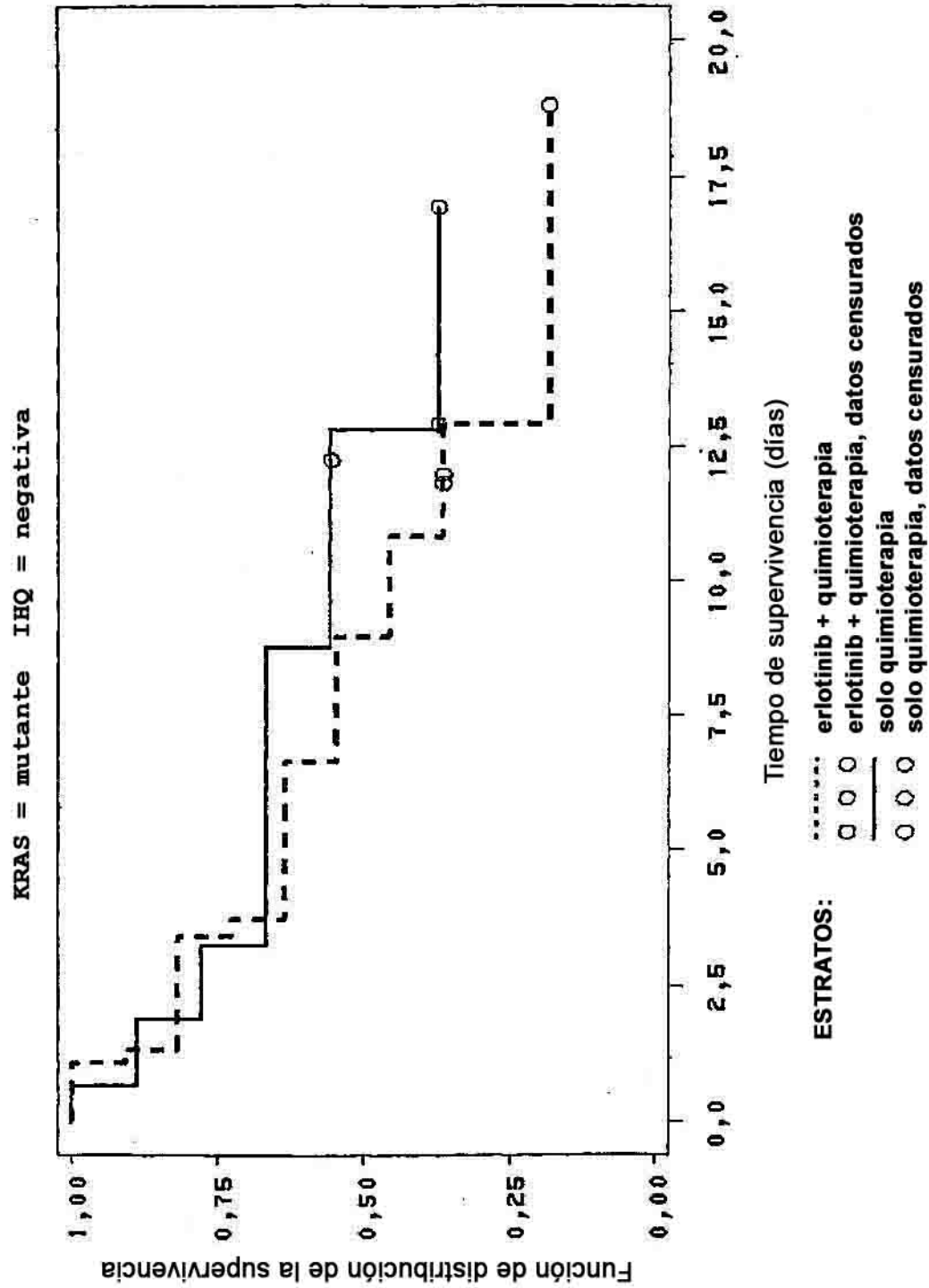


Figura 10

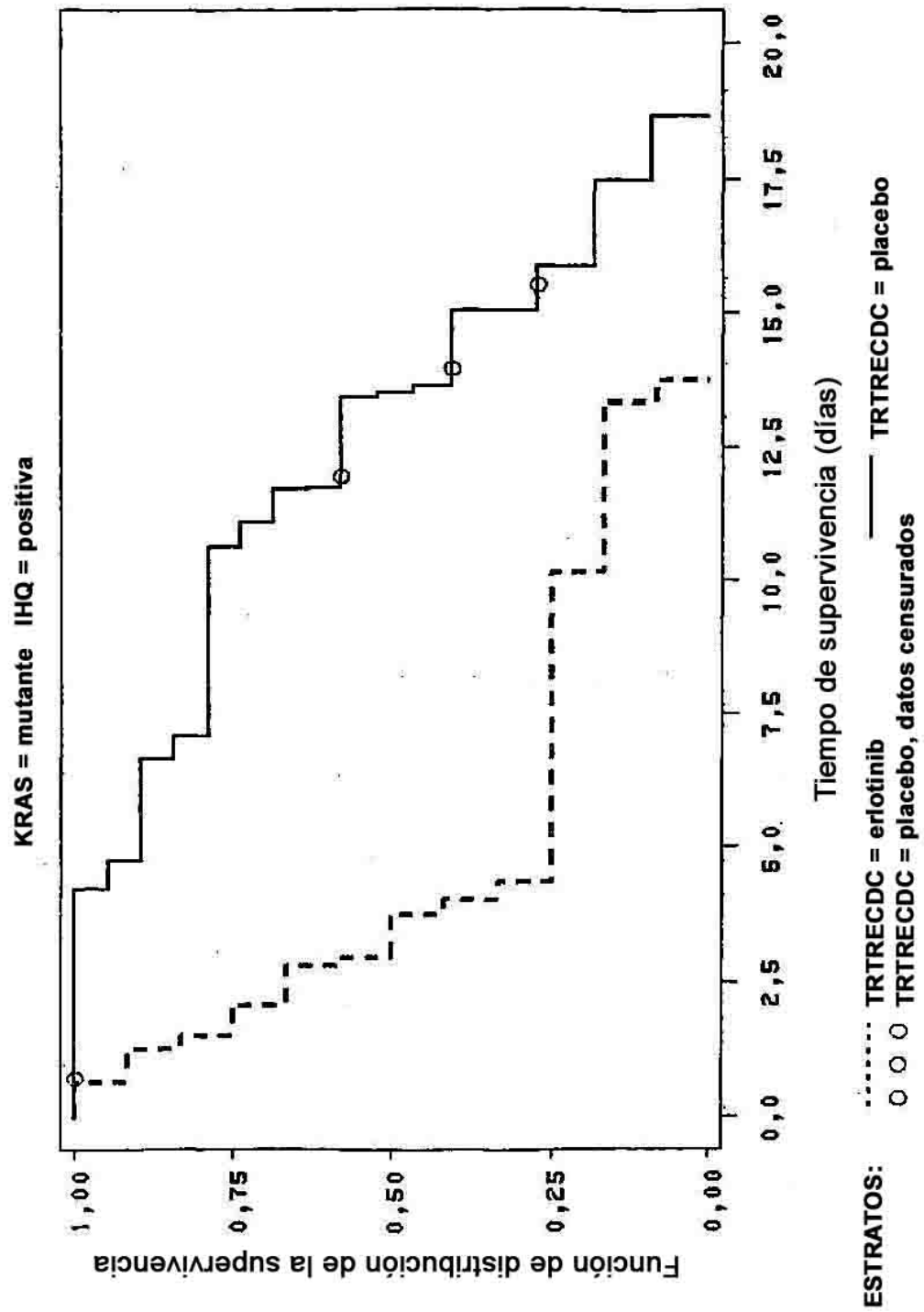


Figura 11

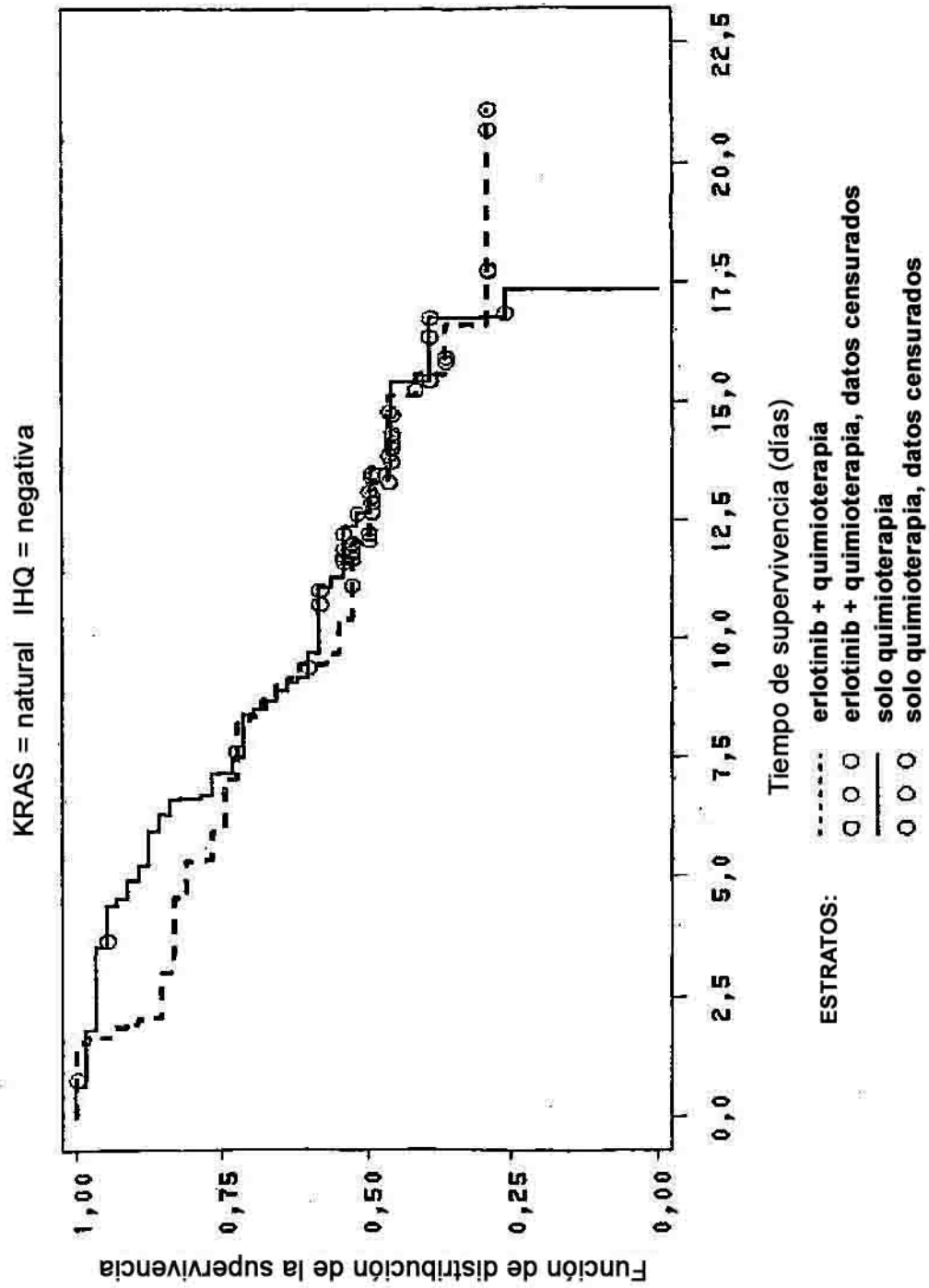


Figura 12

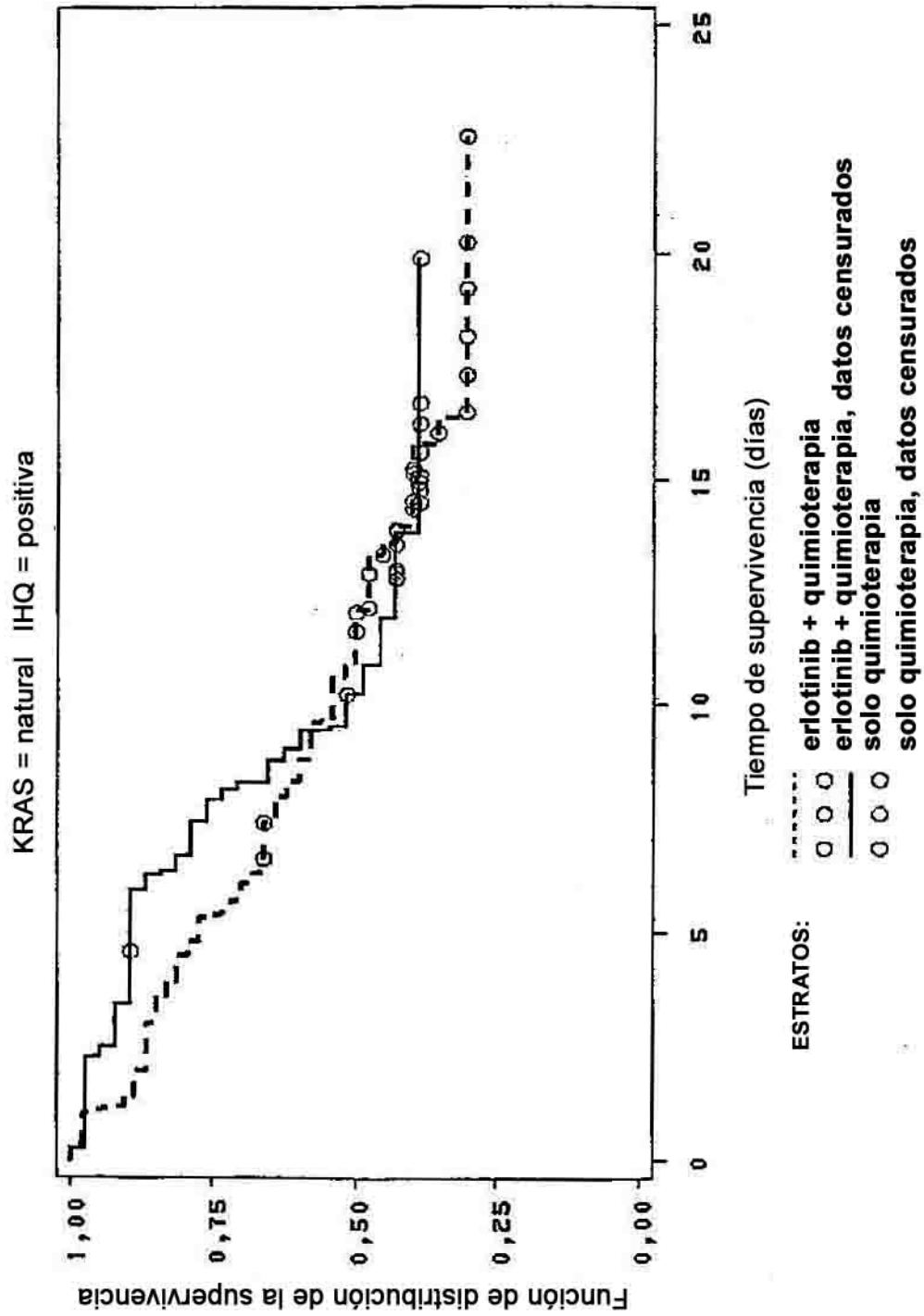


Figura 13