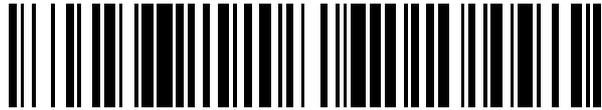


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 749**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2005 E 05757467 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1733056**

54 Título: **Método para determinar la respuesta del cáncer a tratamientos dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico**

30 Prioridad:

31.03.2004 US 558218 P
09.04.2004 US 561095 P
27.04.2004 US 565753 P
27.04.2004 US 565985 P
25.05.2004 US 574035 P
07.06.2004 US 577916 P
29.07.2004 US 592287 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2013

73 Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(50.0%)
55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US y
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)

72 Inventor/es:

BELL, DAPHNE WINIFRED;
HABER, DANIEL A.;
JANNE, PASI ANTERO;
JOHNSON, BRUCE E.;
LYNCH, THOMAS J.;
MEYERSON, MATTHEW;
PAEZ, JUAN GUILLERMO;
SELLERS, WILLIAM R.;
SETTLEMAN, JEFFREY E. y
SORDELLA, RAFFAELLA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 425 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la respuesta del cáncer a tratamientos dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Antecedentes

5 Los cánceres de células epiteliales, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer del bazo, cáncer testicular, cáncer del timo, etc., son enfermedades caracterizadas por el crecimiento acelerado anormal de las células epiteliales. Este crecimiento acelerado causa inicialmente que se forme un tumor. Eventualmente, también se puede producir metástasis a diferentes órganos. Aunque se han logrado avances en el diagnóstico y el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, estas enfermedades siguen provocando una mortalidad significativa.

10 El cáncer de pulmón sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en los países industrializados. Los cánceres que comienzan en los pulmones se dividen en dos tipos principales, el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de pulmón de células pequeñas, dependiendo de cómo lucen las células bajo un microscopio. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes) generalmente se propaga a otros órganos más lentamente de lo que lo hace el cáncer de pulmón de células pequeñas. Alrededor del 75 por ciento de los casos de cáncer de pulmón se clasifican como cáncer de pulmón de células no pequeñas (por ejemplo, los adenocarcinomas), y el otro 25 por ciento son cáncer de pulmón de células pequeñas. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es la principal causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos, Japón y Europa Occidental. Para los pacientes con enfermedad avanzada, la quimioterapia proporciona un modesto beneficio para la supervivencia, pero a costa de una toxicidad significativa, lo que subraya la necesidad de agentes terapéuticos que estén específicamente dirigidos a las lesiones genéticas críticas que dirigen el crecimiento del tumor (Schiller J. H. et al., *N Engl J Med*, 346: 92 - 98, 2002).

25 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína enlazada a la membrana de 170 kilodaltons (kDa), expresada en la superficie de las células epiteliales. EGFR es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento de proteínas tirosina quinasas, una clase de moléculas reguladoras del ciclo celular. (W. J. Gullick et al, 1986, *Cancer Res.*, 46: 285 - 292). EGFR se activa cuando su ligando (ya sea EGF o TGF- α) se enlaza al dominio extracelular, lo que resulta en la autofosforilación del dominio intracelular de la tirosina quinasa del receptor (S. Cohen et al., 1980, *J. Biol., Chem.*, 255: 4834 - 4842; A. B. Schreiber et al., 1983, *J. Biol., Chem.*, 258: 846 - 853).

30 EGFR es el producto proteico de un oncogén que promueve el crecimiento, erbB o ErbB1, que no es más que uno de los miembros de una familia, es decir, la familia ERBB de protooncogenes, que se cree que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y la progresión de muchos cánceres humanos. En particular, se ha observado un aumento de expresión de EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como de glioblastomas. La familia ERBB de oncogenes codifica cuatro receptores transmembrana estructuralmente relacionados, a saber, EGFR, HER-2/neu (erbB2), HER-3 (erbB3) y HER-4 (erbB4). Clínicamente, se ha reportado que la amplificación del oncogén ERBB y/o la sobreexpresión del receptor en tumores se correlacionan con la recurrencia de la enfermedad y con un pobres pronóstico para el paciente, así como con la capacidad de respuesta a la terapia. (L. Harris et al., 1999, *Int., J. Biol., Markers*, 14: 8 - 15, y J. Mendelsohn y J. Baselga, 2000, *Oncogene*, 19: 6550 - 6565).

40 El EGFR se compone de tres dominios principales, a saber, el dominio extracelular (ECD), que está glicosilado y contiene el bolsillo que enlaza al ligando con dos regiones ricas en cisteína; un dominio transmembrana corto, y un dominio intracelular que tiene actividad intrínseca de tirosina quinasa. La región transmembrana une el dominio de enlazamiento del ligando con el dominio intracelular. El análisis de secuencia de aminoácidos y de ADN, así como los estudios de las formas no glicosiladas de EGFR, indican que el esqueleto de la proteína del EGFR tiene una masa de 132 kDa, con 1186 residuos de aminoácidos (A. L. Ullrich et al., 1984, *Nature*, 307: 418 - 425; J. Downward et al., 1984, *Nature*, 307: 521 - 527; C. R. Carlin et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 257 - 264; y F. L. V. Mayes y M. D. Waterfield, 1984, *The EMBO J.*, 3: 531 - 537).

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

Se han identificado una variedad de inhibidores de EGFR, incluyendo una cantidad que ya ha sometida a ensayos clínicos para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Para ver un resumen reciente, véase de Bono, J. S. y Rowinsky, E. K. (2002), "The ErbB receptor Family: A Therapeutic Targer for Cancer", Trends in Molecular Medicine, 8, S 19 - 26.

5 Un conjunto prometedor de objetivos para la intervención terapéutica en el tratamiento del cáncer incluye los miembros del eje de quinasa HER. Se favorece frecuentemente su expresión en tumores epiteliales sólidos, por ejemplo, de la próstata, de pulmón y de mama, y también se favorece su expresión en los tumores de glioblastoma. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro del eje de la quinasa HER, y ha sido el objetivo de elección para el desarrollo de varias terapias diferentes contra el cáncer. Los inhibidores de la tirosina
10 quinasa del EGFR (EGFR-TKI) se encuentran entre estas terapias, ya que se requiere la fosforilación reversible de los residuos de tirosina para la activación de la ruta del EGFR. En otras palabras, los EGFR-TKI bloquean un receptor de la superficie celular responsable de la activación y / o el mantenimiento de la ruta de señalización celular que induce el crecimiento de células tumorales y la división. Específicamente, se cree que estos inhibidores interfieren con el dominio quinasa de EGFR, denominado como HER-1. Entre los EGFR-TKI más prometedores
15 están tres series de compuestos: quinazolininas, piridopirimidinas y pirrolopirimidinas.

Dos de los compuestos más avanzados en el desarrollo clínico incluyen el Gefitinib (compuesto ZD1839 desarrollado por AstraZeneca UK Ltd.; disponible bajo el nombre comercial IRESSA; en lo sucesivo, "IRESSA") y Erlotinib (compuesto OSI-774 desarrollado por Genentech, Inc. y OSI Pharmaceuticals, Inc.; disponible bajo el nombre comercial de TARCEVA; en lo sucesivo, "TARCEVA"), ambos han generado resultados clínicos alentadores.
20 El tratamiento convencional contra el cáncer tanto con IRESSA como con TARCEVA supone la administración oral diaria de no más de 500 mg de los compuestos respectivos. En mayo de 2003, IRESSA se convirtió en el primero de estos productos en llegar al mercado de los Estados Unidos, cuando fue aprobado para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón avanzado de células no pequeñas.

IRESSA es una quinazolina oralmente activa que funciona inhibiendo en forma directa la fosforilación de la tirosina quinasa en la molécula del EGFR. Compite por el sitio de enlazamiento del trifosfato de adenosina (ATP), conduciendo a la supresión del eje de la quinasa HER. El mecanismo exacto de la respuesta de la IRESSA no es completamente entendido, sin embargo, los estudios sugieren que la presencia del EGFR es un prerrequisito necesario para su acción.
25

Una limitación significativa en el uso de estos compuestos es que los receptores de los mismos pueden desarrollar una resistencia a sus efectos terapéuticos después de que inicialmente responden a la terapia, o pueden no responder a los EGFR-TKI en ningún grado medible en absoluto. De hecho, sólo el 10 - 15 por ciento de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado de células no pequeñas responde a los inhibidores de la quinasa del EGFR. Por lo tanto, sería extremadamente benéfico una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes de la sensibilidad a IRESSA y TARCEVA en la selección de la terapia para aquellos individuos que
30 tienen más probabilidades de beneficiarse de dicha terapia.
35

Existe una necesidad significativa en la técnica por un tratamiento satisfactorio del cáncer, y específicamente de cánceres de células epiteliales tales como el de pulmón, de ovario, de mama, de cerebro. Han Yuchun et al. (Cancer Research, vol. 56, no. 17, 1996, páginas 3859 - 3861) describe los efectos de un inhibidor de tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) sobre un EGFR truncado (U87MG, Δ -EGFR). Este truncamiento en el marco de 801 pb trae como resultado una proteína del EGFR que pierde una región extracelular grande.
40

El documento WO 02/102976 se refiere a la identificación de las quinasas mutantes de BCR-ABL que exhiben resistencia al inhibidor de tirosina quinasa St1-571, los cánceres de colon y de próstata, que incorporan los beneficios de la terapia del TKI y vencen la falta de sensibilidad mostrada por los pacientes. Dicho tratamiento podría tener un impacto dramático en la salud de las personas, y especialmente en las personas mayores, entre los que el cáncer es muy común.
45

Resumen

La presente invención se define en y por medio de las reivindicaciones anexas.

La terapia con el inhibidor de tirosina quinasa (TKI) tal como con gefitinib (IRESSA®) no es efectiva en la gran mayoría de las personas que se ven afectadas con los cánceres mencionados anteriormente. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la presencia de mutaciones somáticas en el dominio quinasa del EGFR aumenta sustancialmente la sensibilidad del EGFR con TKI tal como IRESSA, TARCEVA. Por ejemplo menos del 30% de los pacientes que tienen tal cáncer son susceptibles al tratamiento por los TKI actuales, mientras que más del 50%, más preferiblemente del 60, 70, 80, 90% de los pacientes que tienen una mutación en el dominio
50 quinasa del EGFR son susceptibles. Además, estas mutaciones confieren aumento de la actividad de la quinasa del
55

EGFR. Por lo tanto, los pacientes que tienen estas mutaciones probablemente serán sensibles a la terapia actual con inhibidor de tirosina quinasa (TKI), por ejemplo, gefitinib.

En consecuencia, la presente invención proporciona un nuevo método para determinar la probabilidad de la efectividad de un tratamiento dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un paciente humano afectado con cáncer. El método comprende la detección de la presencia o ausencia de al menos una diferencia del ácido nucleico en el dominio quinasa del gen *erbB1* obtenido a partir de una muestra biológica obtenida de dicho paciente en relación con el gen de tipo silvestre *erbB1*. La presencia de al menos una diferencia indica que el tratamiento dirigido al EGFR es probable que sea efectivo. Preferiblemente, la diferencia de ácido nucleico aumenta la actividad de la quinasa del EGFR. El paciente puede ser tratado entonces con un tratamiento dirigido al EGFR. En una forma de realización de la presente invención, el tratamiento dirigido al EGFR es un inhibidor de la tirosina quinasa. En una forma de realización preferida, el inhibidor de la tirosina quinasa es una anilinoquinazolina. La anilinoquinazolina puede ser una anilinoquinazolina sintética. Preferiblemente, la anilinoquinazolina sintética es ya sea gefitinib o erlotinib. En otra forma de realización, el tratamiento dirigido al EGFR es un inhibidor irreversible del EGFR, que incluye al ácido 4-dimetilamino-but-2-enoico [4 - (3-cloro-4-fluorofenilamino)-3-ciano-7-etoxi-quinolin-6-il]amida ("EKB-569", a veces también denominado como "EKI-569", véase, por ejemplo el documento WO/2005/018677 y Torrance et al., *Nature Medicine*, vol. 6, No. 9, septiembre de 2000, p. 1024) y/o HKI-272 o HKI-357 (Wyeth; véase Greenberger et al., *Proc 11avo Simposio NCI EORTC-AACR sobre nuevos medicamentos en la terapia contra el cáncer*, *Clinical Cancer Res.* Vol. 6, Suplemento, noviembre de 2000, ISSN 1078 - 0432; en Rabindran et al., *Cancer Res.* 64: 3958 - 3965 (2004); Holbro y Hynes, *Ann. Rev. Pharm. Tox.* 44: 195 - 217 (2004); Tsou et al., *J. Med. Chem.* 2005, 48, 1107 - 1131, y Tejpar et al., *J. Clin. Oncol. ASCO Annual Meeting Proc.* Vol., 22, No. 14S: 3579 (2004)).

En una forma de realización de la presente invención, se obtiene el EGFR de una muestra biológica de un paciente con o en riesgo de desarrollar cáncer. La variación en el dominio quinasa del EGFR (o el gen *erbB1*) efectúa la estructura conformacional del bolsillo de enlazamiento del ATP. Preferiblemente, la variación en el dominio quinasa del EGFR es una supresión en el marco o una sustitución en el exón 18, 19, 20 o 21.

En una forma de realización, la supresión en el marco es en el exón 19 del EGFR (*erbB1*). La supresión en el marco en el exón 19 comprende preferiblemente una supresión de al menos los aminoácidos leucina, arginina, ácido glutámico y alanina, en los codones 747 748, 749, y 750. En una forma de realización, la supresión en el marco comprende los nucleótidos 2235 a 2249 y elimina los aminoácidos 746 a 750 (la secuencia de ácido glutámico, leucina, arginina, ácido glutámico, y alanina), véase la Tabla 2, la Tabla S2, la Figura 2B, la Figura 4A, la Figura 5, la SEQ ID No: 511, la SEQ ID No: 763, la Figura 6C y la Figura 8C. En otra forma de realización, la supresión en el marco comprende los nucleótidos 2236 a 2250 y elimina los aminoácidos 746 a 750, véase la Tabla S2, la Figura 5, la SEQ ID No: 511, la SEQ ID No: 763 y la Figura 6C. Alternativamente, la supresión en el marco comprende los nucleótidos 2240 a 2251, véase la Tabla 2, la Figura 2C, la Figura 4A, la Figura 5, la SEQ ID No: 511, la SEQ ID No: 763 para los nucleótidos 2240 a 2257, véase la Tabla 2, la Tabla S3A, la Figura 2A, la Figura 4A, la Figura 5, la SEQ ID No: 511, la Figura 6C, y la Figura 8E. Alternativamente, la supresión en el marco comprende los nucleótidos 2239 a 2247 junto con una sustitución de citosina por guanina en el nucleótido 2248, véase la Tabla S3A y la Figura 8D, o una supresión de los nucleótidos 2238 a 2255 junto con una sustitución de timina por adenina en el nucleótido 2237, véase la Tabla S3A y la Figura 8F, o una supresión de los nucleótidos 2254 a 2277, véase la Tabla S2. Alternativamente, la supresión en el marco comprende los nucleótidos 2239 - 2250 de 1TTAAGAGAAGCA; 2251A> C, o 2240 - 2254 de 1TAAGAGAAGCA, o 2257 - 2271 de 1CCGAAAGCCAACAAG, como se muestra en la Tabla S3B.

En otra forma de realización, la sustitución es en el exón 21 del EGFR. La sustitución en el exón 21 comprende al menos un aminoácido. En una forma de realización, la sustitución en el exón 21 comprende una sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 2573, véase la Figura 4A y la Figura 5, la SEQ ID No: 511, la SEQ ID No: 763. Esta sustitución da como resultado una sustitución de aminoácidos, donde la Leucina de tipo silvestre se reemplaza con una arginina en el aminoácido 858, véase la Figura 5, la Tabla 2, la Tabla S2, la Tabla S2A, la Figura 2D, la Figura 6A, la figura 8B, y la SEQ ID No: 512, la SEQ ID No: 763. Alternativamente, la sustitución en el exón 21 comprende una sustitución de una adenina por una timina en el nucleótido 2582, véase la Figura 4A y la Figura 5, la SEQ ID No: 511, la SEQ ID No: 763. Esta sustitución da como resultado una sustitución de aminoácidos, donde la Leucina de tipo silvestre se reemplaza con una glutamina en el aminoácido 861, véase la Figura 5, la Tabla 2, la Figura 2E, la Tabla S3B, y la SEQ ID NO: 512, la SEQ ID No: 763.

La sustitución también puede ser en el exón 18 del EGFR. En una forma de realización, la sustitución es en el exón 18 es una timina por una guanina en el nucleótido 2155, véase la Figura 4A y la Figura 5, la SEQ ID No: 511. Esta sustitución da como resultado una sustitución de aminoácidos, en donde la glicina de tipo silvestre se sustituye con una cisteína en el codón 719, véase la Figura 5, la SEQ ID No: 512. En otra forma de realización, la sustitución en el exón 18 es una adenina por una guanina en el nucleótido 2155 que resulta en una sustitución de aminoácidos, en donde la glicina de tipo silvestre se sustituye con una serina en el codón 719, véase la Tabla S2, la figura 6B, la figura 8A, la figura 5, la SEQ ID No: 511 y 512 y 763.

5 En otra forma de realización, la sustitución es una inserción de guanina, guanina y timina (GGT) después del nucleótido 2316 y antes del nucleótido 2317 de la SEQ ID No: 763 (236_2317 ins GGT). Esto también puede ser descrito como una inserción de valina (V) en el aminoácido 772 (P772_H733 INSV). Otras mutaciones se muestran en la Tabla S3B e incluyen, por ejemplo, y la inserción de CAACCCGG después del nucleótido 2309 y antes del nucleótido 2310 de la SEQ ID No: 763 y una inserción de GCGTGGACA después del nucleótido 2311 y antes del nucleótido 2312 de la SEQ ID No: 763. La sustitución también puede ser en el exón 20 y en una forma de realización es una sustitución de AA por GG en los nucleótidos 2334 y 2335, véase la Tabla S3B.

10 En resumen, en formas de realización preferidas, la variación de ácidos nucleicos del gen erbB1 es una sustitución de una timina por una guanina o una adenina por una guanina en el nucleótido 2155 de la SEQ ID No: 763, una supresión de los nucleótidos 2235 a 2249 , 2240 a 2251, 2240 a 2257, 2236 a 2250, 2254 a 2277, o 2236 a 2244 de la SEQ ID No: 763, una inserción de los nucleótidos guanina, guanina y timina (GGT) después del nucleótido 2316 y antes del nucleótido 2317 de la SEQ ID No: 763, y una sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 2573 o una adenina por una timina en el nucleótido 2582 de la SEQ ID No: 763.

15 La detección de la presencia o ausencia de al menos una variación de ácido nucleico se puede determinar mediante la amplificación de un segmento de ácido nucleico que codifica al receptor. El segmento a amplificar es de 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente, 500 nucleótidos de longitud, y lo más preferiblemente 100 nucleótidos de longitud o menos. El segmento que se amplifica puede incluir una pluralidad de variaciones.

20 En otra forma de realización, la detección de la presencia o ausencia de al menos una variación permite el contacto del ácido nucleico del EGFR que contiene un sitio de variación con al menos una sonda de ácido nucleico. La sonda preferentemente hibrida con una secuencia de ácido nucleico que incluye un sitio de variación y que contiene bases de nucleótidos complementarios en el sitio de la variación en condiciones de hibridación selectiva. La hibridación se puede detectar con un marcador detectable.

25 En otra forma de realización, la detección de la presencia o ausencia de al menos una variación comprende la secuenciación de al menos una secuencia de ácido nucleico y la comparación de la secuencia obtenida con la secuencia conocida del ácido nucleico erbB1. Alternativamente, la presencia o ausencia de al menos una variación comprende la determinación espectrométrica de masa de al menos una secuencia de ácido nucleico.

30 En una forma de realización preferida, la detección de la presencia o ausencia de al menos una variación del ácido nucleico comprende realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia del ácido nucleico erbB1 que contiene la variación hipotética se amplifica y se determina la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado. La determinación de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado comprende la secuenciación de al menos un segmento de ácido nucleico. Alternativamente, los productos de amplificación se pueden analizar mediante el uso de cualquier método capaz de separar los productos de amplificación según su tamaño, incluyendo la electroforesis en gel automatizada y manual y similares.

35 Alternativamente, la detección de la presencia o ausencia de al menos una variación comprende la determinación del haplotipo de una pluralidad de variaciones en un gen.

40 En otra forma de realización, la presencia o ausencia de una variación del EGFR puede ser detectada mediante el análisis del producto del gen erbB1 (proteína). En esta forma de realización, se utiliza una sonda que se enlaza específicamente a una variante del EGFR. En una forma de realización preferida, la sonda es un anticuerpo que se enlaza preferentemente a una variante del EGFR. La presencia de una variante del EGFR predice la probabilidad de la eficacia de un tratamiento dirigido al EGFR. Alternativamente, la sonda puede ser un fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o un aptámero.

45 La presente invención proporciona además una sonda que se enlaza específicamente en condiciones de enlazamiento selectivo a una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una variación del ácido nucleico en el gen EGFR (erbB1). En una forma de realización, la variación es una mutación en el dominio quinasa de erbB1 que confiere un cambio estructural en el bolsillo de enlazamiento de ATP.

50 La sonda puede comprender una secuencia de ácido nucleico de aproximadamente 500 bases de nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 100 bases de nucleótidos, y más preferiblemente de aproximadamente 50 o aproximadamente 25 bases de nucleótidos o menos de longitud. La sonda puede estar compuesta de ADN, ARN, o ácido nucleico peptídico (PNA). Además, la sonda puede contener un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un marcador fluorescente o enzimático.

La presente invención permite adicionalmente un nuevo método para determinar la probabilidad de la efectividad de un tratamiento dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un paciente afectado con cáncer. El método comprende la determinación de la actividad de la quinasa del EGFR en una muestra biológica de un paciente. Un aumento en la actividad de la quinasa después de la estimulación con un ligando del EGFR, en

comparación con un control normal, indica que el tratamiento dirigido al EGFR es probable que sea efectivo.

La presente invención permite además un método novedoso para el tratamiento de un paciente afectado con o en riesgo de desarrollar cáncer. El método implica la determinación de si el dominio quinasa del EGFR de un paciente contiene al menos una variación del ácido nucleico. Preferiblemente, el EGFR se encuentra en el sitio del tumor o

5 cáncer y la variación del ácido nucleico es somática. La presencia de tal variación indica que un tratamiento dirigido al EGFR será efectivo. Si la variación está presente, se administra el inhibidor de la tirosina quinasa al paciente.

Como anteriormente, el inhibidor de la tirosina quinasa administrado a un paciente identificado puede ser una anilinoquinazolina o un inhibidor de tirosina quinasa irreversible, tal como, por ejemplo, EKB-569, HKI-272 y / o TKI-357 (Wyeth). Preferiblemente, la anilinoquinazolina es una anilinoquinazolina sintética y lo más preferiblemente la

10 anilinoquinazolina sintética es gefitinib y erlotinib.

El cáncer a ser tratado por los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga. En una forma de

15 realización preferida, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

También está previsto un kit para la implementación de los métodos de PCR de la presente invención. El kit incluye al menos un par de cebadores degenerados diseñados para hibridar con regiones de ácido nucleico que bordean los genes que codifican para el bolsillo de enlazamiento de ATP del dominio quinasa del EGFR. Además, el kit contiene los productos y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación por PCR, y las instrucciones.

20 En una forma de realización preferida, los pares de cebadores contenidos en el kit se seleccionan entre el grupo que consiste de la SEQ ID N o: 505, la SEQ ID No: 506, la SEQ ID No: 507, y la SEQ ID No: 508. También se prefieren los cebadores enumerados en la Tabla 6 y 7 en los ejemplos.

En aún otra forma de realización, la presente memoria descriptiva da a conocer un método para seleccionar un compuesto que inhibe la actividad catalítica de quinasa de una variante del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Como una primera etapa, una variante del EGFR se pone en contacto con un compuesto potencial. La actividad de la quinasa resultante de la variante del EGFR se detecta a continuación, y se selecciona un compuesto que inhibe la actividad de la quinasa de la variante del EGFR. En una forma de realización, la variante del EGFR está contenida dentro de una célula. El método también se puede utilizar para seleccionar un compuesto que inhibe la actividad de la quinasa de la variante del EGFR que tiene una mutación secundaria en el dominio

25 quinasa que confiere resistencia a un TKI, por ejemplo, gefitinib o erlotinib.

En una forma de realización, se marca la variante del EGFR. En otra forma de realización, el EGFR se enlaza a un soporte sólido. En una forma de realización preferida, el soporte sólido es un chip de proteína.

35 Se divulga una composición farmacéutica que inhibe la actividad catalítica de la quinasa de una variante del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El compuesto que inhibe la actividad catalítica de la quinasa de una variante del EGFR se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula pequeña, un péptido, una proteína, un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un ANP, un ARNpi, un aptámero de oligonucleótido, y el aptámero peptídico.

También se da a conocer un método para tratar un paciente que tiene una enfermedad mediada por EGFR. De acuerdo con el método, se administra al paciente la composición farmacéutica que inhibe la actividad catalítica de la

40 quinasa de una variante del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

En una forma de realización, la enfermedad mediada por EGFR es cáncer. En una forma de realización preferida, el cáncer es de origen epitelial. Por ejemplo, el cáncer es cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga. En una forma de realización preferida, el cáncer es cáncer de pulmón de células

45 no pequeñas.

En otra forma de realización, se divulga un método para predecir la adquisición de mutaciones secundarias (o la selección de mutaciones) en el dominio quinasa del gen erbB1. Se pone en contacto una célula que expresa una forma variante del gen erbB1 con una dosis efectiva incluso sub-lethal de un inhibidor de la tirosina quinasa. Se seleccionan las células que son resistentes a un efecto de la detención del crecimiento del inhibidor de la tirosina quinasa y se analiza el ácido nucleico de erbB1 por la presencia de mutaciones adicionales en el dominio quinasa de erbB1. En una forma de realización, la célula está in vitro. En otra forma de realización, se obtiene la célula de un

50

animal transgénico. En una forma de realización, el animal transgénico es un ratón. En este modelo de ratón, las células a ser estudiadas se obtienen a partir de una biopsia del tumor. Las células que contienen una mutación secundaria en el dominio quinasa de erbB1 seleccionadas por la presente invención se pueden utilizar en los métodos anteriores para seleccionar un compuesto que inhibe la actividad de la quinasa de la variante del EGFR que tiene una mutación secundaria en el dominio quinasa.

En una forma de realización alternativa para la predicción de la adquisición de mutaciones secundarias en el dominio quinasa del gen erbB1, se ponen primero en contacto células que expresan una forma variante del gen erbB1 con una cantidad efectiva de un agente mutagénico. La mutagénesis es, por ejemplo, metanosulfonato de etilo (EMS), N-etil-N-nitrosourea (ENU), N-metil-N-nitrosourea (MNU), clorhidrato de focarbaxina (Prc), metanosulfonato de metilo (MeMS), clorambucil (Ch1), melfalán, clorhidrato de porcarbaxina, ciclofosfamida (Cp), sulfato de dietilo (Et₂SO₄), monómero de acrilamida (AA), trietilen-melamina (TEM), mostaza nitrogenada, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), 7,12 dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfán, o etil metanosulfonato (ETMs). Se pone luego la célula en contacto con una dosis efectiva incluso sub-letal de un inhibidor de la tirosina quinasa. Se seleccionan las células que son resistentes a un efecto de la detención del crecimiento del inhibidor de la tirosina quinasa y se analiza el ácido nucleico de erbB1 por la presencia de mutaciones adicionales en el dominio quinasa erbB1.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1B muestran una ilustración representativa de la respuesta al gefitinib en un cáncer difícil de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Tomografía computarizada de tórax del caso 6 (Tabla 1), que demuestra (Figura 1A) una gran masa en el pulmón derecho antes del tratamiento con gefitinib y (Figura 1B) una marcada mejoría seis semanas después de iniciado el tratamiento con Gefitinib.

La Figura 2 muestra las mutaciones del EGFR en tumores sensibles al gefitinib.

Las Figuras 2A-2C muestran la secuencia de nucleótidos del gen *EGFR* en muestras de tumores con supresiones en el marco de heterocigotos dentro del dominio quinasa (picos dobles) (SEQ ID Nos: 643 a 654, respectivamente, en orden de aparición). Se muestran los seguimientos en ambas direcciones tanto sentido como antisentido para demostrar los dos puntos de rompimiento de la supresión; se muestra la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre en letras mayúsculas, y la secuencia mutante en letras minúsculas. El punto de rompimiento 5' de la mutación del L747-T751insS está precedida por una sustitución de T por C que no altera el aminoácido codificado.

La Figura 2D y la Figura 2E muestran mutaciones heterocigotas en sentido erróneo (flechas) que resultan en sustituciones de aminoácidos dentro del dominio de la tirosina quinasa (SEQ ID Nos: 656 y 658). Los picos dobles representan dos nucleótidos en el sitio de mutaciones heterocigotas. Para la comparación, también se muestra la secuencia de tipo silvestre correspondiente (SEQ ID Nos: 655 y 657).

La figura 2F es una representación esquemática de moléculas del EGFR dimerizado enlazadas por medio del ligando EGF. Se resaltan el dominio extracelular (que contiene dos dominios del ligando del receptor [L] y un dominio como el de la furina), la región transmembrana y el dominio citoplasmático (que contiene el dominio catalítico de la quinasa). Se indica la posición de la tirosina¹⁰⁶⁸ (Y-1068), un sitio de autofosforilación utilizado como un marcador de la activación del receptor, junto con los efectores secuencia abajo activados por la autofosforilación del EGFR (STAT3, MAP quinasa (MAPK), y AKT). Se muestra la ubicación de las mutaciones asociadas a tumores, todos dentro del dominio de la tirosina quinasa.

La Figura 3 demuestra la activación mejorada que depende de EGF del EGFR mutante y aumento de la sensibilidad del EGFR mutante al gefitinib.

La figura 3A muestra una evolución en el tiempo de la activación inducida por ligandos de los mutantes de L747-P753insS y L858R, en comparación con el EGFR de tipo silvestre, después de la adición de EGF a las células privadas de suero. Se utiliza la autofosforilación del EGFR como un marcador de la activación del receptor, utilizando una transferencia tipo Western con un anticuerpo que reconoce específicamente el residuo de tirosina¹⁰⁶⁸ fosforilada del EGFR (panel de la izquierda), en comparación con los niveles totales del EGFR expresado en células Cos-7 (control; panel de la derecha). Se mide la autofosforilación del EGFR en intervalos después de la adición de EGF (10 ng / ml).

La Figura 3B es una representación gráfica de la inducción de EGF de la fosforilación del receptor de tipo silvestre y mutante (véase el panel A). Se cuantificaron las autorradiografías de tres experimentos independientes usando el software de imágenes NIH; se normalizó la intensidad de la fosforilación del EGFR con la expresión de la proteína total, y se muestra como la activación del receptor en porcentaje, con una desviación estándar.

- La figura 3C muestra una inhibición dependiente de la dosis de la activación del EGFR por gefitinib. La autofosforilación de la tirosina¹⁰⁶⁸ del EGFR se demuestra por medio de análisis de transferencias tipo Western de células Cos-7 que expresan receptores de tipo silvestre o mutante, y se estimularon con 100 ng / ml de EGF durante 30 min. Las células se dejaron sin tratar (U) o se las trató previamente durante 3 horas con concentraciones crecientes de gefitinib como se muestra (panel de la izquierda). Las cantidades totales de proteína EGFR expresadas se muestran como control (panel de la derecha).
- La Figura 3D muestra la cuantificación de los resultados de dos experimentos descritos para el panel 3C (software de imágenes NIH). Las concentraciones de EGFR fosforilado se normalizaron a los niveles de expresión de proteína y se expresaron como la activación del receptor en porcentaje.
- La Figura 4 demuestra la agrupación de mutaciones en los sitios críticos dentro del bolsillo de enlazamiento de ATP del EGFR.
- La Figura 4A muestra la posición de la superposición de supresiones en el marco en el exón 19 y mutaciones en sentido erróneo en el exón 21 del gen *EGFR*, en múltiples casos de NSCLC (SEQ ID Nos: 495 a 504 (ADN)). Se muestra la secuencia parcial de nucleótidos para cada exón, con supresiones marcadas por líneas punteadas y las mutaciones de sentido erróneo resaltadas y subrayadas; se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del EGFR de tipo silvestre (SEQ ID Nos: 493 y 494 (ADN) y 509-510 (amino ácido)).
- La Figura 4B muestra la estructura tridimensional de la hendidura de ATP del EGFR flanqueada por los lóbulos amino (N) y carboxilo (C) del dominio quinasa (coordenadas derivadas de PDB 1M14, y mostradas mediante el uso de software Cn3D). El inhibidor, que representa Gefitinib, se describe ocupando la hendidura de ATP. Se muestran las ubicaciones de las dos mutaciones de sentido erróneo, dentro del bucle de activación de la quinasa; las tres supresiones en el marco están todas presentes dentro de otro bucle, que flanquea la hendidura de ATP.
- La Figura 4C es un primer plano del dominio quinasa del EGFR, que muestra los residuos de aminoácidos críticos implicados en el enlazamiento ya sea a ATP o al inhibidor. Específicamente, los compuestos de 4-anilinoquinazolina tales como gefitinib inhiben la catálisis ocupando el sitio de enlazamiento de ATP, donde forman enlaces de hidrógeno con residuos de metionina⁷⁹³ (M793) y cisteína⁷⁷⁵ (C775), mientras que su anillo de anilina está cerca de residuos de metionina⁷⁶⁶ (M766), lisina⁷⁴⁵ (K745) y leucina⁷⁸⁸ (L788). Se predice que las supresiones en el marco dentro del bucle que están dirigidas por mutaciones alteran la posición de estos aminoácidos en relación con el inhibidor. Se muestran residuos mutados en el bucle de activación de la tirosina quinasa.
- La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen *erbB1*. Los aminoácidos se representan como letras individuales, que son conocidas por aquellos capacitados en la técnica. Las variaciones de nucleótidos en el dominio quinasa se destacan por medio del número del paciente, véase la Tabla 2. La SEQ ID No: 511 incluye los nucleótidos 1 a 3633. La SEQ ID No: 512 incluye los aminoácidos 1 a 1210.
- Figuras 6A - 6C: Alineación de secuencias de regiones seleccionadas dentro de los dominios quinasa del EGFR y de B-Raf. Representación de las mutaciones del EGFR en NSCLC humano. Las mutaciones del EGFR (gb: X00588) en los tumores de NSCLC se resaltan en gris. Las mutaciones de B-Raf (gb: M95712) en múltiples tipos de tumores (5) se resaltan en negro. Los asteriscos indican los residuos conservados entre EGFR y B-Raf. La Figura 6A representa mutaciones del L858R en el bucle de activación (SEQ ID Nos 477 - 479). La Figura 6B representa al mutante G719S en el bucle de P (SEQ ID Nos 480 - 482). La Figura 6C representa mutantes de supresión del exón 19 del EGFR (SEQ ID Nos 483 - 489).
- Figura 7: Posiciones de las mutaciones de sentido erróneo G719S y L858R y la supresión Del-1 en la estructura tridimensional del dominio quinasa del EGFR. El bucle de activación se muestra en amarillo, el bucle P es de color azul y el lóbulo C y el lóbulo N son como se indica. Los residuos dirigidos por mutación o supresión se resaltan en rojo. La mutación Del-1 dirige los residuos ELREA en los codones 746 a 750. Las mutaciones se encuentran en regiones altamente conservadas dentro de quinastas y se encuentran en bucle p y en el bucle de activación, que rodean la región donde se predice que ATP y también gefitinib y erlotinib se enlazan.
- Figuras 8A-8F. Cromatogramas representativos de ADN del EGFR a partir de tejido normal y de los tejidos tumorales. Las ubicaciones de las mutaciones identificadas son las siguientes. La Figura 8A representa el exón 18 del bucle P del dominio quinasa (SEQ ID Nos. 659 - 660). La Figura 8B representa el exón 21 del bucle A del dominio quinasa (SEQ ID Nos. 661 - 662). La Figura 8C representa el exón 19 de Del-1 del dominio quinasa (SEQ ID Nos. 663 - 665). La Figura 8D representa el exón 19 de Del-3 del dominio quinasa (SEQ ID Nos. 666 - 668). La Figura 8E representa el exón 19 de Del-4 del dominio quinasa (SEQ ID No. 669 - 671). La Figura 8F representa el exón 19 de Del-5 del dominio quinasa (SEQ ID No. 672 - 674).
- Figura 9: La alineación de la secuencia de los polipéptidos BCR-ABL y EGFR y la ubicación de los residuos que confieren un fenotipo resistente a fármacos. El polipéptido EGFR (SEQ ID No: 492) codificado por la secuencia de

nucleótidos descrita en el GenBank, número de acceso NM005228 y el polipéptido BCR-ABL (SEQ ID No: 491) codificado por la secuencia de nucleótidos descrita en el GenBank número de acceso M14752 son residuos alineados y conservados, se presentan sombreados. Las mutaciones de BCR-ABL que confieren resistencia al inhibidor de tirosina quinasa imatinib (STI571, Glivec / Gleevec) se indican mediante asteriscos.

5 La Figura 10 muestra el proceso de toma de decisión para un paciente con NSCLC metastásico en fase de pruebas del EGFR.

10 La Figura 11 muestra un diagrama de los exones 18-24 del EGFR (no a escala). Las flechas describen la ubicación de las mutaciones identificadas. Los asteriscos denotan el número de pacientes con mutaciones en cada ubicación. El diagrama ampliado representa la superposición de las supresiones del exón 19, y el número de pacientes (n) con cada supresión. Obsérvese que estos resultados no son inclusivos de todas las mutaciones del EGFR hasta la fecha.

Descripción detallada

15 La presente invención proporciona un nuevo método para determinar la probabilidad de la eficacia de un tratamiento dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un paciente afectado con cáncer. El método comprende la detección de la presencia o ausencia de al menos una variación del ácido nucleico en el dominio quinasa del gen erbB obtenido a partir de una muestra biológica obtenida de dicho paciente. La presencia de al menos una variación indica que tratamiento dirigido al EGFR probablemente sea efectivo. Preferiblemente, la variación de ácido nucleico aumenta la actividad quinasa del EGFR. El paciente puede ser tratado luego con un tratamiento dirigido al EGFR. En una forma de realización de la presente invención, el tratamiento dirigido al EGFR es un inhibidor de tirosina quinasa. En una forma de realización preferida, el inhibidor de tirosina quinasa es una anilinoquinazolina. El anilinoquinazolina puede ser una anilinoquinazolina sintética. Preferiblemente, la anilinoquinazolina sintético es o bien gefitinib o erlotinib.

Definiciones:

25 Los términos "ErbB1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico", y "EGFR" se utilizan aquí de forma intercambiable y se refieren al EGFR de la secuencia nativa divulgada, por ejemplo, en Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56: 881-914 (1987), que incluye variantes del mismo (por ejemplo, un EGFR mutante por supresión como en Humphrey et al. PNAS (EUA) 87: 4.207-4.211 (1990)). ErbB1 se refiere al gen que codifica al producto de la proteína del EGFR.

30 El término "variación de ácidos nucleicos que incrementa la actividad de la quinasa" como se utiliza aquí se refiere a una variación (es decir, una mutación) en la secuencia de nucleótidos de un gen que se traduce en un aumento de la actividad de la quinasa. El aumento de la actividad de la quinasa es un resultado directo de la variación en el ácido nucleico y está asociado con la proteína codificada por el gen.

35 El término "fármaco" o "compuesto" como se utiliza aquí se refiere a una entidad química o producto biológico, o combinación de entidades químicas o de productos biológicos, administrado a una persona para tratar o prevenir o controlar una enfermedad o condición. La entidad química o producto biológico es preferiblemente, pero no necesariamente, un compuesto de bajo peso molecular, sino que también puede ser un compuesto más grande, por ejemplo, un oligómero de ácidos nucleicos de aminoácidos o de carbohidratos que incluye sin limitación proteínas, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, glicoproteínas, los ARNpi, lipoproteínas, aptámeros, y modificaciones y combinaciones de los mismos.

40 El término "genotipo" en el contexto de esta invención se refiere a la forma alélica particular de un gen, que se puede definir por medio del (de los) nucleótido(s) particular(es) presente(s) en una secuencia de ácido nucleico en un (unos) sitio(s) particular(es).

45 Los términos "forma variante de un gen", "forma de un gen", o "alelo" se refieren a una forma específica de un gen en una población, siendo diferente la forma específica de otras formas del mismo gen en la secuencia de al menos un, y frecuentemente más de un, sitios de variantes dentro de la secuencia del gen. Las secuencias en estos sitios de variantes que se diferencian entre los diferentes alelos de un gen se llaman " variaciones de la secuencia del gen" o "variaciones" o "variantes". Otros términos conocidos en la técnica que son equivalentes incluyen mutación y polimorfismo, aunque se utiliza a menudo mutación para referirse a un alelo asociado con un fenotipo perjudicial. En aspectos preferidos de esta invención, las variaciones se seleccionan del grupo que consiste de las variaciones enumeradas en las tablas de variación presentadas aquí.

50 En el contexto de esta invención, el término "sonda" se refiere a una molécula que puede distinguir en forma detectable entre moléculas objetivo que difieren en su estructura. La detección puede llevarse a cabo en una

5 variedad de diferentes maneras, dependiendo del tipo de sonda utilizada y del tipo de molécula objetivo. Así, por ejemplo, la detección puede basarse en la discriminación de niveles de actividad de la molécula objetivo, pero preferiblemente se basa en la detección de enlazamientos específicos. Los ejemplos de tales enlazamientos específicos incluyen enlazamiento de anticuerpos e hibridación de sondas de ácido nucleico. Por lo tanto, por ejemplo, las sondas pueden incluir sustratos enzimáticos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y preferiblemente sondas de hibridación de ácido nucleico.

10 Como se utilizan aquí, los términos "efectivo" y "efectividad" incluyen tanto efectividad farmacológica como seguridad fisiológica. La efectividad farmacológica se refiere a la capacidad del tratamiento que da como resultado un efecto biológico deseable en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad, u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órganos y / o de organismos (a menudo denominados como efectos secundarios) que resultan de la administración del tratamiento. "Menor efectividad" significa que el tratamiento da como resultado un nivel más bajo terapéuticamente de la efectividad farmacológica y / o un mayor nivel terapéutico de efectos fisiológicos adversos.

15 El término "cebador", como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de polinucleótidos a lo largo de una hebra complementaria cuando se coloca bajo condiciones en las cuales se cataliza la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario con un polinucleótido. Tales condiciones incluyen la presencia de cuatro diferentes trifosfatos de nucleótidos o análogos de nucleósidos y uno o más agentes de polimerización tales como ADN polimerasa y / o transcriptasa inversa, en un amortiguador apropiado ("amortiguador" incluye sustituyentes que son cofactores, o que afectan el pH, la fuerza iónica, etc.), y una temperatura adecuada. Un cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia de un agente para la polimerasa. Un cebador típico contiene al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud de una secuencia sustancialmente complementaria a la secuencia objetivo, pero se prefieren cebadores algo más largos. Por lo general, los cebadores contienen aproximadamente 15-26 nucleótidos, pero se pueden emplear también cebadores más largos.

25 Un cebador siempre contendrá una secuencia sustancialmente complementaria con la secuencia objetivo, que es la secuencia específica que va a ser amplificada, con la cual puede hibridarse. Un cebador puede, opcionalmente, comprender también una secuencia promotora. El término "secuencia promotora" define una sola hebra de una secuencia de ácido nucleico que es reconocida específicamente por una ARN polimerasa que se enlaza con una secuencia reconocida e inicia el proceso de transcripción por medio del cual se produce un transcrito de ARN. En principio, se puede emplear cualquier secuencia promotora para la cual existe una polimerasa conocida y disponible que es capaz de reconocer la secuencia de iniciación. Los promotores conocidos y útiles son aquellos que son reconocidos por ciertas polimerasas de bacteriófagos, tales como los bacteriófagos T3, T7 o SP6.

35 Un "microarreglo" es un arreglo lineal o bidimensional de regiones preferiblemente discretas, teniendo cada una un área definida, formada sobre la superficie de un soporte sólido. La densidad de las regiones discretas sobre un microarreglo se determina por medio del número total de polinucleótidos objetivo que van a ser detectados sobre la superficie de un único soporte en fase sólida, preferiblemente al menos aproximadamente 50/cm², más preferiblemente al menos aproximadamente 100/cm², incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 500/cm², y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 1.000/cm². Como se utiliza aquí, un microarreglo es un arreglo de cebadores de oligonucleótidos colocados sobre un chip u otras superficies utilizadas para amplificar o clonar polinucleótidos objetivo. Ya que la posición de cada grupo particular de cebadores en el arreglo es conocida, se pueden determinar las identidades de los polinucleótidos objetivo con base en su enlazamiento con una posición particular en el microarreglo.

45 El término "etiqueta" se refiere a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia del polinucleótido objetivo en una muestra del ensayo. Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos, cromóforos de nucleótidos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, fracciones quimioluminiscentes, partículas magnéticas, fracciones bioluminiscentes, y similares. Como tal, una etiqueta es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

El término "soporte" se refiere a soportes convencionales tales como perlas, partículas, tiras reactivas, fibras, filtros, membranas y soportes de silano o de silicato tales como placas de vidrio.

50 El término "amplificación" se utiliza en sentido amplio para significar la creación de un producto de amplificación que puede incluir, por ejemplo, moléculas objetivo adicionales, o moléculas tipo objetivo o moléculas complementarias a la molécula objetivo, las cuales se crean en virtud de la presencia de la molécula objetivo en la muestra. En la situación en donde el objetivo es un ácido nucleico, se puede elaborar enzimáticamente un producto de amplificación con ADN o ARN polimerasa o transcriptasas inversas.

55 Como se utiliza aquí, una "muestra biológica". se refiere a una muestra de tejido o fluido aislada de un individuo, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, biopsias de tumor, orina, heces, esputo, líquido

5 cefalorraquídeo, líquido pleural, aspirados de pezón, fluido linfático, secciones externas de la piel, del tracto respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células (incluyendo, pero sin limitarse a, células de la sangre), tumores, órganos, y también muestras de constituyentes de cultivo celular in vitro. En una forma de realización preferida, la muestra es de una resección, biopsia broncoscópica, o biopsia con aguja gruesa de un tumor primario o metastásico, o un bloque de células de líquido pleural. Además, se utilizan muestras de aspirado con aguja fina. Las muestras pueden ser ya sea de tejido embebido en parafina o congelado.

10 El término "anticuerpo" significa que se trata de una proteína de inmunoglobulina que es capaz de enlazar un antígeno. Anticuerpo como se utiliza se entiende que incluye fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, capaces de enlazar al antígeno o un fragmento antigénico de interés. Preferiblemente, el enlazamiento del anticuerpo con el antígeno inhibe la actividad de una forma variante del EGFR.

15 El término "anticuerpo humanizado" se utiliza aquí para describir moléculas de anticuerpo completas, es decir, compuesta de dos cadenas livianas completas y dos cadenas pesadas completas, así como anticuerpos que consisten únicamente de fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab)₂, y Fv, en los que las CDR proceden de una fuente no humana y la porción restante de la molécula de Ig o fragmento de la misma se deriva de un anticuerpo humano, preferiblemente producido a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo humano.

20 Los términos "anticuerpo humano" y "anticuerpo humanizado" se utilizan aquí para describir un anticuerpo a partir del cual se derivan todas las porciones de la molécula de anticuerpo de una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo humano. Tales anticuerpos humanos son los más deseables para uso en terapias de anticuerpos, ya que tales anticuerpos podrían provocar poca o ninguna respuesta inmune en el paciente humano.

25 El término "anticuerpo quimérico" se utiliza aquí para describir una molécula de anticuerpo, así como fragmentos de anticuerpos, como se describió anteriormente en la definición del término "anticuerpo humanizado". El término "anticuerpo quimérico" incluye anticuerpos humanizados. Los anticuerpos quiméricos tienen al menos una porción de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada o liviana que se obtiene a partir de una primera especie de mamífero y otra parte de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada o liviana que se obtiene a partir de una segunda especie diferente de mamífero.

30 Preferiblemente, la región variable se deriva de una especie de mamífero no humano y la región constante se deriva de una especie humana. Específicamente, el anticuerpo quimérico se produce preferiblemente a partir de una secuencia de 9 nucleótidos de un mamífero no humano que codifica una región variable y una secuencia de nucleótidos de un humano que codifica una región constante de un anticuerpo.

La Tabla 2 es una lista parcial de variaciones de la secuencia de ADN en el dominio quinasa de erbB1 relevante para los métodos descritos en la presente invención. Estas variaciones fueron identificados por los inventores en estudios de muestras biológicas de pacientes con NSCLC que respondieron a gefitinib y pacientes sin exposición a gefitinib.

35 Las moléculas de ácido nucleico se pueden aislar de una muestra biológica particular utilizando cualquiera de una cantidad de procedimientos, que son conocidos en el arte, siendo el procedimiento particular de aislamiento elegido el apropiado para la muestra biológica particular. Por ejemplo, pueden ser útiles los procedimientos de lisis alcalina y de congelación-descongelación para obtener moléculas de ácido nucleico a partir de materiales sólidos; pueden ser útiles los procedimientos de lisis alcalina y calor para obtener moléculas de ácido nucleico de la orina; y se puede utilizar extracción de la proteinasa K para obtener ácido nucleico de la sangre (Rolf, A et al. PCR: Clinial Diagnostics and Research, Springer (1994)).

Métodos de detección

45 La determinación de la presencia o ausencia de una variación particular o de una pluralidad de variaciones en el dominio quinasa del gen erbB1 en un paciente con, o en riesgo de desarrollar cáncer, se puede llevar a cabo en una variedad de formas. Tales pruebas se llevan a cabo comúnmente utilizando ADN o ARN recolectado de muestras biológicas, por ejemplo, biopsias de tejidos, orina, heces, esputo, sangre, células, raspados de tejido, aspirados de mama u otros materiales celulares, y se pueden realizar por medio de una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, PCR, hibridación con sondas específicas de alelos, detección de mutación enzimática, escisión química de faltas de correlación, espectrometría de masas o secuenciación de ADN, incluyendo minisequenciación.

50 En formas particulares de realización, se pueden llevar a cabo hibridaciones con sondas específicas de alelos en dos formatos: (1) oligonucleótidos específicos de alelos enlazados a una fase sólida (vidrio, silicio, membranas de nailon) y las muestras marcadas en solución, como en muchas aplicaciones de chips de ADN, o (2) muestra enlazada (a menudo ADN clonado o ADN amplificado por PCR) y oligonucleótidos marcados en solución (ya sea específico del alelo o corto para permitir la secuenciación por medio de hibridación). Los ensayos de diagnóstico

55 pueden involucrar un panel de variaciones, a menudo sobre un soporte sólido, que permite la determinación

simultánea de más de una variación.

En otro aspecto, la determinación de la presencia de al menos una actividad de quinasa que incrementa la variación de ácidos nucleicos en el gen erbB1 puede implicar una prueba de determinación del haplotipo. Los métodos para determinar los haplotipos son conocidos por aquellos capacitados en el arte, como por ejemplo, en el documento WO 00/04194.

Preferiblemente, la determinación de la presencia o ausencia de una actividad de quinasa que incrementa la variación de ácidos nucleicos involucra la determinación de la secuencia del sitio o sitios de la variación por medio de métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Alternativamente, la determinación de la presencia o ausencia de una actividad de quinasa que incrementa la variación de ácidos nucleicos puede abarcar secuenciación o minisequenciación del ADN de terminación de la cadena, hibridación de oligonucleótidos o espectrometría de masas.

Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para predecir la probabilidad de la efectividad (o falta de efectividad) de un tratamiento dirigido al EGFR en un paciente afectado con o en riesgo de desarrollar cáncer. Preferiblemente, los cánceres incluyen cáncer de origen epitelial, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga. En una forma de realización preferida, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

La presente invención se refiere generalmente a la identificación de las variaciones en el dominio quinasa del gen erbB1 que son indicativas de la eficacia de un tratamiento dirigido al EGFR en un paciente con o en riesgo de desarrollar cáncer. Adicionalmente, la identificación de variaciones específicas en el dominio quinasa del EGFR, en efecto, puede ser utilizada como una prueba de diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, la presencia de al menos una variación en el dominio quinasa de erbB1 indica que un paciente probablemente se beneficiará del tratamiento con un compuesto dirigido al EGFR, tal como, por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa.

Los métodos para las pruebas de diagnóstico son bien conocidas en el arte y se divulgan en la solicitud de patente WO 00/04194. En un método de ejemplo, la prueba de diagnóstico comprende la amplificación de un segmento de ADN o ARN (generalmente después de convertir el ARN en ADNc) que abarca una o más variaciones conocidas en el dominio quinasa de la secuencia del gen erbB1. Este segmento amplificado es luego secuenciado, y / o ometido a electroforesis en gel de poliacrilamida con el fin de identificar las variaciones de ácido nucleico en el segmento amplificado.

PCR

En una forma de realización, la invención proporciona un método de cribado de las variantes en el dominio quinasa del gen erbB1 en una muestra biológica de ensayo por medio de PCR o, alternativamente, en una reacción en cadena de ligación (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran, et al., 1988. Science 241: 1077-1080; y Nakazawa, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 91: 360-364), el último de los cuales puede ser particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en el gen para EGFR (véase, Abravaya, et al., 1995. Nucl. Acids Res. 23: 675-682). El método comprende las etapas de diseño de cebadores degenerados para amplificar la secuencia objetivo, correspondiendo los cebadores a una o más regiones conservadas del gen, amplificando la reacción con los cebadores utilizando, como molde, un ADN o ADNc obtenido a partir de una muestra biológica de prueba y analizando los productos de PCR. La comparación de los productos de la PCR de la muestra biológica de prueba con una muestra de control indica las variaciones en la muestra biológica de prueba. El cambio puede ser o bien en ausencia o en presencia de una variación de ácido nucleico en la muestra biológica de prueba.

Los métodos alternativos de amplificación incluyen: replicación de secuencia autosostenida (véase, Guatelli, et al., 1990., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87: 1874 - 1878), sistema de amplificación transcripcional (véase, Kwoh, et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86: 1173 - 1177); Qb replicasa (véase, Lizardi, et al., 1988. BioTechnology 6: 1197), o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por aquellos capacitados en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en cantidades muy bajas.

Los cebadores útiles de acuerdo con la presente invención se diseñan utilizando secuencias de aminoácidos de las secuencias de ácido nucleico o proteína del dominio quinasa del gen erbB1 como guía, por ejemplo, la SEQ ID No: 493, la SEQ ID No: 494, la SEQ ID No: 509, y la SEQ ID NO: 510. Los cebadores se diseñan en las regiones homólogas del gen en el que al menos dos regiones de homología están separadas por una región divergente de secuencia variable, siendo la secuencia variable, ya sea en longitud o en la secuencia de ácidos nucleicos.

5 Por ejemplo, la secuencia idéntica o altamente homóloga, preferiblemente al menos 80% - 85%, más preferiblemente al menos 90 - 99% de la secuencia homóloga de aminoácidos de al menos aproximadamente 6, preferiblemente al menos 8 - 10 aminoácidos consecutivos. Lo más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos es 100% idéntica. Los cebadores directos e inversos se diseñan con base en el mantenimiento de la degeneración del codón y la representación de los diferentes aminoácidos en una posición dada entre los miembros conocidos de la familia de genes. El grado de homología como se menciona en el presente documento se basa en el análisis de una secuencia de aminoácidos usando un software de comparación de secuencia estándar, como proteína-BLAST utilizando la configuración predeterminada (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) .

Tabla 3 a continuación representa el uso de los códigos de degenerados y sus símbolos estándar:

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F)	TCT Ser (S)	TAT Tyr (Y)	TGT Cys (C)
	TTC"	TCC"	TAC	TGC
	TTA Leu (L)	TCA"	TAA Ter	TGA Ter
	TTG"	TCG"	TAG Ter	TGG Trp (W)
	CTT Leu (L)	CCT Pro (P)	CAT His (H)	CGT Arg (R)
	CTC"	CCC"	CAC"	CGC"
	CTA"	CCA"	CAA Gln (Q)	CGA"
	CTG"	CCG"	CAG"	CGG"
A	ATT Ile (I)	ACT Thr (T)	AAT Asn (N)	AGT Ser (S)
	ATC"	ACC"	AAC"	AGC"
	ATA"	ACA"	AAA Lys (K)	AGA Arg (R)
	ATG Met (M)	ACG"	AAG"	AGG"
G	GTT Val (V)	GCT Ala (A)	GAT Asp (D)	GGT Gly (G)
	GTC"	GCC"	GAC"	GGC"
	GTA"	GCA"	GAA Glu (E)	GGA"
	GTG "	GAG"	GAG"	GGG"

10

15 Preferiblemente se evitan cualquiera de los codones degenerados 6 veces tales como L, R y S ya que en la práctica introducirán una degeneración 6 veces más alta. En el caso de L, TTR y CTN son YTN comprometidos (degeneración de 8 veces), en el caso de R, CGN y AGR se comprometen en MGN (degeneración de 8 veces), y, finalmente, S, TCN y AGY que pueden verse comprometidas con WSN (degeneración de 16 veces). En los tres casos en 6 de ellos coincidirá con la secuencia objetivo. Para evitar esta pérdida de especificidad, es preferible evitar estas regiones, o para hacer dos poblaciones, cada una con el codón degenerado alternativo, por ejemplo, para S incluyen TCN en una reserva, y AGY en la otra.

20 Los cebadores pueden diseñarse utilizando una cantidad de programas de ordenador disponibles, incluyendo, pero sin limitarse a Oligo Analyzer 3.0; Oligo Calculator; NetPrimer; Methprimer; Primer3; WebPrimer; PrimerFinder; Primer9; Oligo2002; Pride o GenomePride; Oligos y Codehop. La información detallada acerca de estos programas se puede obtener, por ejemplo, de www.molbiol.net.

Los cebadores se pueden marcar usando las etiquetas conocidas por una persona capacitada en en la técnica. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a marcadores radioactivos, fluorescentes, colorantes, y enzimáticos.

5 El análisis de los productos de amplificación se puede realizar utilizando cualquier método capaz de separar los productos de amplificación de acuerdo con su tamaño, incluyendo electroforesis automatizada y manual en gel, espectrometría de masas, y similares.

Alternativamente, los productos de amplificación se pueden separar utilizando las diferencias de secuencia, utilizando SSCP, DGGE, TGGE, escisión química o polimorfismos de fragmentos de restricción, así como la hibridación, por ejemplo, con matrices de ácidos nucleicos.

10 Los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos, amplificación y análisis son de rutina para una persona capacitada en la técnica y se pueden encontrar ejemplos de protocolos, por ejemplo, en el Molecular Cloning: A Laboratory Manual (conjunto de 3 volúmenes) Ed. Joseph Sambrook, David W. Russell y Joe Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory, tercera edición (Enero 15, 2001), ISBN: 0879695773. Una fuente de protocolos particularmente útil para los métodos utilizados en la amplificación por PCR es PCR (Basics: From Background to Bench) por M. J. McPherson, S. G. Müller, R. Beynon, C. Howe, Springer Verlag, primera edición (octubre 15, 2000), ISBN: 15 0387916008.

20 Preferiblemente, se amplifican los exones 19 y 21 del EGFR humano por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores: cebador sentido del Exón 19, 5'-GCAATATCAGCCTTAGGTG CGGCTC-3' (SEQ ID NO: 505); cebador antisentido del Exón 19, 5'-CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG-3' (SEQ ID NO: 506); cebador sentido del Exón 21, 5'-CTAACGTTTCG CCAGCCATAAGTCC-3' (SEQ ID NO: 507), y cebador antisentido del Exón 21, 5'-GCTGCGAGCTACCCAG AATGTCTGG-3' (SEQ ID No: 508).

25 En una realización alternativa, se pueden identificar las mutaciones en un gen *EGFR* de una célula de muestra por medio de las alteraciones en los patrones de escisión de la enzima de restricción. Por ejemplo, se aísla el ADN de la muestra y del control, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y se determina la longitud de los fragmentos por electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en longitud de los fragmentos entre el ADN de la muestra y del control indican mutaciones en el ADN de la muestra. Por otra parte, el uso de ribozimas específicos de la secuencia (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.493.531) se puede utilizar para cuantificar la presencia de mutaciones específicas por medio del desarrollo o la pérdida de un sitio de escisión del ribozima.

30 Otros métodos para detectar mutaciones en el gen *EGFR* incluyen métodos en los cuales se usa protección de los agentes de escisión para detectar bases mal emparejadas en heterodúplex de ARN / ARN o ARN / ADN. Véase, por ejemplo, Myers, et al., 1985. Science 230: 1242. En general, la técnica del arte de "escisión de falta de correlación" comienza proporcionando heterodúplex formados por hibridación (etiquetado) de ARN o ADN que contiene la secuencia del EGFR de tipo silvestre con ARN o ADN potencialmente mutante obtenido a partir de una muestra de tejido. Los dúplex bicatenarios se tratan con un agente que escinde regiones monocatenarias del dúplex tales como 35 aquellas que existirán debido a una falta de correlación de pares de bases entre las cadenas del control y de la muestra. Por ejemplo, se pueden tratar dúplex de ARN / ADN con ARNasa e híbridos de ADN / ADN tratados con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones no coincidentes. En otras formas de realización, se pueden tratar ya sea los dúplex de ADN / ADN o ARN / ADN con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina con el fin de digerir las regiones no coincidentes. Después de la digestión de las regiones no coincidentes, se separa luego 40 el material resultante por tamaño en geles de poliacrilamida desnaturalizantes para determinar el sitio de la mutación. Véase, por ejemplo Cotton, et al., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85: 4397; Saleeba, et al., 1992. Methods Enzymol. 2 17: 286 - 295. En una forma de realización, se puede marcar el ADN o ARN de control para la detección.

45 En aún otra forma de realización, la reacción de escisión de emparejamientos erróneos emplea una o más proteínas que reconocen pares de bases desapareadas en ADN bicatenario (llamadas enzimas de "reparación de emparejamientos erróneos del ADN") en sistemas definidos para detectar y mapear mutaciones puntuales en los ADNc del EGFR obtenidos a partir de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de E. coli escinde A en emparejamientos erróneos de G / A y la timidina ADN glicosilasa de células HeLa escinde T en emparejamientos erróneos de G / T. Véase, por ejemplo, Hsu, et al., 1994. Carcinogenesis 15: 1657 - 1662. De acuerdo con un 50 ejemplo de una forma de realización, se hibrida una sonda basada en una secuencia mutante del EGFR, por ejemplo, una secuencia der EGFR DEL-1 hasta DEL-5, G719S, G857V, L883S o L858R, con un ADNc u otro producto de ADN de una(s) célula(s) de prueba. Se trata el dúplex con una enzima de reparación de emparejamientos erróneos de ADN, y los productos de escisión, si los hay, se pueden detectar a partir de protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.459.039.

55 En otras formas de realizaciones, se usarán las alteraciones en la movilidad electroforética para identificar mutaciones en genes *EGFR*. Por ejemplo, se puede utilizar un polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP)

para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo silvestre. Véase, por ejemplo, Orita, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA: 86: 2766; Cotton, 1993. Mutat. Res. 285: 125 - 144; Hayashi, 1992. Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73 - 79. Se desnaturalizarán fragmentos de ADN monocatenarios de ácidos nucleicos del EGFR del control y de la muestra y se permitirá que se renaturalicen. La estructura secundaria de ácidos nucleicos monocatenarios varía de acuerdo con la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección incluso de un solo cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede ser mejorada mediante el uso de ARN (en lugar de ADN), en donde la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una forma de realización, el método objetivo utiliza análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias con base en los cambios en la movilidad electroforética. Véase, por ejemplo, Keen, et al., 1991. Trends Genet. 7: 5.

En aún otra forma de realización, el movimiento de fragmentos mutantes o de tipo silvestre en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturizante se ensaya usando electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE). Véase, por ejemplo, Myers, et al., 1985. Nature 313: 495. Cuando se utiliza DGGE como el método de análisis, se modificará el ADN para asegurar que no se desnaturaliza completamente, por ejemplo, añadiendo una abrazadera de GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alto punto de fusión por medio de PCR. En una forma de realización adicional, se usa un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturizante para identificar diferencias en la movilidad del ADN de control y de muestra. Véase, por ejemplo, Rosenbaum y Reissner, 1987. Biophys. Chem., 265: 12753.

Los ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero no se limitan a, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva, o extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores de oligonucleótidos en los que se coloca la mutación conocida en el centro y luego se hibrida con ADN objetivo bajo condiciones que permiten la hibridación sólo si se encuentra una coincidencia perfecta. Véase, por ejemplo, Saiki, et al., 1986. Nature 324: 163; Saiki, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 86: 6230. Tales oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con ADN objetivo amplificado por PCR o una cantidad de mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos están unidos a la membrana de hibridación y se hibridan con el ADN objetivo marcado.

Alternativamente, puede utilizarse la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación selectiva por PCR conjuntamente con la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden portar la mutación de interés en el centro de la molécula (por lo que la amplificación depende de hibridación diferencial; véase, por ejemplo, Gibbs, et al., 1989., Nucl. Acids Res. 17: 2437 - 2448) o en el terminal 3' del extremo de un cebador donde, en condiciones apropiadas, falta de coincidencia puede prevenir, o reducir la extensión de la polimerasa (véase, por ejemplo, Prossner, 1993. Tibtech. 11: 238). Además, puede ser deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear una detección basada en la escisión. Véase, por ejemplo, Gasparini, et al., 1992. Mol. Cell Probes 6: 1. Se prevé que en ciertas formas de realizaciones también puede realizar la amplificación usando Taq ligasa para la amplificación. Véase, por ejemplo, Barany, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 88: 189. En tales casos, la ligación se producirá sólo si existe una correspondencia perfecta en el terminal 3' de la secuencia 5', haciendo posible detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico mediante la búsqueda de la presencia o ausencia de amplificación.

Soporte sólido y sonda

En una forma de realización alternativa, la detección de la presencia o ausencia de la al menos una variación de ácido nucleico que implica poner en contacto una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la región deseada del gen erbB1, identificado anteriormente, con una sonda. La sonda es capaz de distinguir una forma particular del gen o la presencia o una variación o variaciones particulares, por ejemplo, mediante enlazamiento o hibridación diferencial. Por lo tanto, los ejemplos de sondas incluyen sondas de hibridación de ácido nucleico, sondas de ácido nucleico peptídico, sondas que contienen nucleótidos que también contienen al menos un análogo de nucleótido, y anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, y otras sondas como se discute en este documento. Aquellos capacitados en la técnica están familiarizados con la preparación de sondas con especificidades particulares. Aquellos capacitados en la técnica reconocerán que se pueden ajustar una variedad de variables para optimizar la discriminación entre dos formas variantes de un gen, incluyendo cambios en la concentración salina, temperatura, pH y la adición de diferentes compuestos que afectan la afinidad diferencial de GC versus los pares de bases AT, tales como cloruro de tetrametil amonio. (Véase Current Protocols in Molecular Biology por F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, K. Struhl y V. B. Chanda (editores), John Wiley & Sons.)

Por lo tanto, en formas de realización preferidas, la detección de la presencia o ausencia de al menos una variación implica poner en contacto una secuencia de ácido nucleico que incluye al menos un sitio de variación con una sonda, preferiblemente una sonda de ácido nucleico, donde la sonda preferentemente hibrida con una forma de la secuencia de ácido nucleico que contiene una base complementaria en el sitio de la variación en comparación con la hibridación con una forma de la secuencia de ácido nucleico que tiene una base no complementaria en el sitio de la variación, donde se lleva a cabo la hibridación en condiciones de hibridación selectiva. Tal sonda de hibridación de

ácido nucleico puede abarcar dos o más sitios de variación. A menos que se especifique otra cosa, una sonda de ácido nucleico puede incluir uno o más análogos de ácido nucleico, etiquetas u otros sustituyentes o fracciones siempre que se conserva la función de apareamiento de bases.

5 La sonda se puede diseñar para enlazarse, por ejemplo, al menos con tres nucleótidos continuos en ambos lados de la región suprimida de la SEQ ID No: 495, la SEQ ID NO: 497, o la SEQ ID NO: 499. Tales sondas, cuando se hibrida en las condiciones apropiadas, se enlazarán con la forma variante del EGFR, pero no se enlazará con el EGFR de tipo silvestre.

10 Tales sondas de hibridación son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Eds, (la edición más reciente), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (tercera edición, 2001), vol. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las condiciones de hibridación rigurosa incluirán típicamente concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1 M, más usualmente aproximadamente menos de 500 mM y preferiblemente aproximadamente menos de 200 mM. Las temperaturas de hibridación pueden ser tan bajas como 5° C, pero son típicamente mayores a 22° C, más típicamente mayores aproximadamente a 30° C, y preferiblemente por encima de aproximadamente 37° C. Los fragmentos más largos pueden requerir temperaturas de hibridación mayores para hibridación específica. Otros factores pueden afectar la rigurosidad de la hibridación, incluyendo la composición de bases y la longitud de las cadenas complementarias, la presencia de disolventes orgánicos y el grado de falta de correlación de las bases; la combinación de parámetros usada es más importante que la medida absoluta de cualquiera de ellos solo. Otras condiciones de hibridación que se pueden controlar incluyen el tipo y la concentración del amortiguador, el pH de la solución, la presencia y concentración de los reactivos de bloqueo (por ejemplo, las secuencias de repetición, ADN CotI, el bloqueo de las soluciones de proteína) para disminuir el enlazamiento de fondo, el(los) tipo(s) de detergente(s) y las concentraciones, moléculas tales como polímeros que aumentan la concentración relativa de los polinucleótidos, ión(es) metálicos(s) y su(s) concentración(es), el(los) agente(s) quelante(s) y su(s) concentración(es), y otras condiciones conocidas o que pueden ser descubiertas en la técnica. Se pueden utilizar fórmulas para predecir la temperatura de fusión óptima para una secuencia perfectamente complementaria para una sonda dada, pero las temperaturas de fusión verdaderas para una sonda bajo un conjunto de condiciones de hibridación deben ser determinadas empíricamente. Además, se puede probar una sonda contra su complemento exacto para determinar una temperatura de fusión precisa bajo un conjunto dado de condiciones como se describe en Sambrook et al., "Molecular Cloning", 3 edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Se pueden alterar sistemáticamente las temperaturas de hibridación para una solución de hibridación dada usando un soporte asociado con polinucleótidos objetivo hasta identificar un rango de temperatura que permita la detección del enlazamiento de una sonda detectable al nivel de rigurosidad deseado, ya sea con alta rigurosidad donde sólo hibridan polinucleótidos objetivo con una alto grado de complementariedad, o con una menor rigurosidad donde polinucleótidos objetivo adicionales que tienen regiones de complementariedad con la sonda detectable hibridan por encima del nivel de fondo proporcionado a partir del enlazamiento no específico con polinucleótidos objetivo no complementarios y para el soporte. Cuando se lleva a cabo la hibridación con polinucleótidos objetivo potenciales sobre un soporte bajo un conjunto dado de condiciones, se lava el soporte a continuación, bajo condiciones crecientes de rigurosidad (típicamente menor concentración de sal y / o aumento de la temperatura, pero se pueden alterar otras condiciones) hasta disminuir el enlazamiento de fondo hasta el punto donde se pueden observar señales positivas distintas. Esto puede ser monitoreado en progreso usando un contador Geiger en donde se marcó radiactivamente la sonda, radiográficamente, utilizando un formador de imágenes fluorescentes, o por otros medios de detección de enlazamiento de la sonda. No se permite que el soporte se seque durante tales procedimientos, o se puede enlazar en forma irreversible la sonda incluso con ubicaciones de fondo. Cuando una sonda produce un fondo indeseable o falsos positivos, se emplean reactivos de bloqueo, o se usan diferentes regiones de la sonda o sondas diferentes hasta que se puedan distinguir las señales positivas de las de fondo. Una vez que se encuentran las condiciones que proporcionan una señal satisfactoria por encima del fondo, los polinucleótidos objetivo que proporcionan una señal positiva se aíslan y caracterizan adicionalmente. Los polinucleótidos aislados pueden ser secuenciados; la secuencia se puede comparar con las entradas del banco de datos o con secuencias conocidas; en caso necesario, se pueden obtener clones de longitud completa por medio de técnicas conocidas en la técnica; y se pueden expresar los polinucleótidos utilizando vectores y huéspedes adecuados para determinar si el polinucleótido identificado codifica una proteína que tiene actividad similar a aquella de la cual se deriva el polinucleótido sonda. Las sondas pueden ser de 10 - 50 nucleótidos. Sin embargo, también se pueden emplear sondas más largas, por ejemplo, de 50 - 500 nucleótidos o más grandes.

Soporte de fase sólida

55 El soporte de fase sólida utilizado en los métodos de la presente invención puede ser de cualquier material y estructura sólidos adecuados para dar soporte a la hibridación y síntesis de nucleótidos. Preferiblemente, el soporte de fase sólida comprende al menos una superficie sustancialmente rígida sobre la cual se pueden inmovilizar oligonucleótidos o cebadores de oligonucleótidos. El soporte de fase sólida puede ser elaborado, por ejemplo, de vidrio, polímero sintético, plástico, nailon de malla no dura o de cerámica. Se conocen otros materiales adecuados de soporte sólido y se encuentran fácilmente disponibles para aquellos capacitados en la técnica. El tamaño del soporte sólido puede ser cualquiera de los tamaños estándar de microarreglos, útiles para la tecnología de

microarreglos de ADN, y se puede adaptar el tamaño a la máquina particular que está siendo utilizada para llevar a cabo una reacción de la invención. Los métodos y materiales para la formación de derivados de soportes de fase sólida con el fin de inmovilizar oligonucleótidos son conocidos por aquellos capacitados en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 5.919.523.

5 El soporte sólido puede ser proporcionado en o formar parte de un recipiente que contiene fluido. Por ejemplo, el soporte sólido se puede colocar en una cámara con lados que crean un sello a lo largo del borde del soporte sólido de manera que contenga la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el soporte. En un ejemplo específico, la cámara puede tener paredes a cada lado de un soporte rectangular para garantizar que la mezcla de la PCR se mantenga en el soporte y también para volver toda la superficie útil para proporcionar los cebadores.

10 Los oligonucleótidos o cebadores de oligonucleótidos se pueden fijar, inmovilizar, proporcionar y / o aplicar a la superficie del soporte sólido utilizando cualquier medio disponible para fijar, inmovilizar, proporcionar y / o aplicar los oligonucleótidos en una ubicación particular en el soporte sólido. Por ejemplo, se puede utilizar fotolitografía (Affymetrix, Santa Clara, California) para aplicar los cebadores de oligonucleótidos en una posición particular en un chip o soporte sólido, como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.919.523, 5.837.832, 5.831.070, y 5.770.722. Los cebadores de oligonucleótidos también se pueden aplicar a un soporte sólido tal como se describe en Brown y Shalon, patente de los Estados Unidos No. 5.807.522 (1998). Adicionalmente, se pueden aplicar los cebadores a un soporte sólido utilizando un sistema robótico, tal como uno fabricado por Genetic MicroSystems (Woburn, Massachusetts), GeneMachines (San Carlos, California) o Cartesian Technologies (Irvine, California).

20 En un aspecto de la invención, se lleva a cabo la amplificación en fase sólida de polinucleótidos objetivo a partir de una muestra biológica, en donde se inmovilizan múltiples grupos de cebadores de oligonucleótidos sobre un soporte de fase sólida. En una forma de realización preferida, los cebadores dentro de un grupo comprenden al menos un primer conjunto de cebadores que son idénticos en secuencia y son complementarios a una secuencia definida del polinucleótido objetivo, capaz de hibridar con el polinucleótido objetivo bajo condiciones apropiadas, y son adecuados como cebadores iniciales para la síntesis de ácido nucleico (es decir, extensión o alargamiento de la cadena). Los cebadores seleccionados que cubren una región particular de la secuencia de referencia se inmovilizan, como grupo, sobre un soporte sólido en una ubicación discreta. Preferiblemente, la distancia entre los grupos es mayor que la resolución de los medios de detección que se utilizan para la detección de los productos amplificados. En una forma de realización preferida, los cebadores se inmovilizan para formar un microarreglo o chip que puede ser procesado y analizado a través de procesamiento automatizado. Se utilizan los cebadores inmovilizados 33 para la amplificación en fase sólida de polinucleótidos objetivo bajo condiciones adecuadas para un medio de amplificación de ácidos nucleicos. De esta forma, se pueden determinar en un ensayo la presencia o ausencia de una variedad de variaciones potenciales en el dominio quinasa del gen *erbB1*.

35 Se puede utilizar una población de polinucleótidos objetivo aislada de un individuo sano como control para determinar si una fuente biológica tiene al menos una variación que incrementa la actividad de quinasa en el dominio quinasa del gen *erb1*. Alternativamente, se pueden utilizar los polinucleótidos objetivo aislados de tejido sano del mismo individuo como control como anteriormente.

40 Se pueden llevar a cabo reacciones PCR del tipo *in situ* en los microarreglos esencialmente como se describe, por ejemplo en Embretson et al., *Nature* 362: 359-362 (1993); Gosden et al., *BioTechniques* 15 (1): 78-80 (1993); Heniford et al., *Nuc. Acid Res.* 21 (14): 3.159-3.166 (1993); Long et al., *Histochemistry* 99: 151-162 (1993); Nuovo et al., *PCR Methods and Applications* 2 (4): 305-312 (1993); Patterson et al., *Science* 260: 976-979 (1993).

45 Alternativamente, se pueden determinar las variaciones en el dominio quinasa de *erbB1* mediante técnicas de fase sólida sin llevar a cabo una PCR sobre el soporte. Una pluralidad de sondas de oligonucleótido, conteniendo cada una una variación distinta en el dominio quinasa de *erbB1*, en duplicado, triplicado o cuadruplicado, se pueden enlazar con el soporte de fase sólida. Se puede detectar la presencia o ausencia de variaciones en la muestra biológica de prueba por medio de técnicas de hibridación selectiva, conocidas por aquellos capacitados en la técnica y descritas anteriormente.

Espectrometría de masas

50 En otra forma de realización, se determinan la presencia o ausencia de variaciones de ácido nucleico que incrementan la actividad de quinasa en el dominio quinasa del gen *erbB1* mediante espectrometría de masas. Para obtener una cantidad apropiada de moléculas de ácido nucleico sobre las cuales llevar a cabo la espectrometría de masas, puede ser necesaria una amplificación. Los ejemplos de procedimientos apropiados de amplificación para uso en la invención incluyen: clonación (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (C. R. Newton y A. Graham, PCR, BIOS Publishers, 1994), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wiedmam, M., et al., (1994) PCR Methods Appl. Vol. 3, páginas. 57-64; F. Barnay Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 88,189-93 (1991)), amplificación por

desplazamiento de cadena (SDA) (G. Terrance Walker et al., *Nucleic Acids Res.* 22, 2670-77 (1994)) y variaciones tales como RT-PCR (Higuchi, et al., *Bio / Technology* 11: 1026-1030 (1993)), amplificación específica de alelos (ASA) y procesos basados en la transcripción.

5 Para facilitar el análisis espectrométrico de masas, se puede inmovilizar una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de ácido nucleico que va a ser detectada a un soporte sólido. Los ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen perlas (por ejemplo, de gel de sílice, de vidrio de poro controlado, magnéticas, de Sefadex / Sefarosa, de celulosa), superficies planas o chips (por ejemplo, de filtros de fibra de vidrio, de superficies de vidrio, de superficies metálicas (de acero, de oro, de plata, de aluminio, de cobre y de silicio), capilares, plástico (por ejemplo, membranas de polietileno, polipropileno, poliamida, polivinilidendifloruro o placas de microtitulación)); o alfileres o peines hechos a partir de materiales similares que comprenden perlas o superficies planas o perlas colocadas en pozos en superficies planas tales como obleas (por ejemplo, obleas de silicio).

10 La inmovilización se puede lograr, por ejemplo, con base en la hibridación entre una secuencia de ácido nucleico de captura, que ya ha sido inmovilizada al soporte y una secuencia de ácido nucleico complementaria, que también está contenida dentro de la molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de ácido nucleico que va a ser detectada. Por lo tanto esa hibridación entre las moléculas de ácido nucleico complementarias no se ve obstaculizada por el soporte, el ácido nucleico de captura puede incluir una región espaciadora de al menos aproximadamente cinco nucleótidos de longitud entre el soporte sólido y la secuencia de ácido nucleico de captura. El dúplex formado se escindiría bajo la influencia del pulso láser y se puede iniciar la desorción. La secuencia base enlazada al soporte sólido se puede presentar a través de oligorribonucleótidos u oligodesoxirribonucleótidos naturales, así como análogos (por ejemplo, una estructura de fosfodiéster o fosfotriéster tio-modificado) o empleando imitaciones de oligonucleótidos tales como análogos de PNA (véase, por ejemplo Nielsen et al., *Science*, 254,1497 (1991)) que tornan la secuencia base menos susceptible a degradación enzimática y por lo tanto incrementan la estabilidad total de la secuencia base de captura enlazada al soporte sólido.

25 Antes del análisis espectrométrico de masas, puede ser útil "acondicionar" las moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, para disminuir la energía láser requerida para la volatilización y / o para minimizar la fragmentación. El acondicionamiento se lleva a cabo preferiblemente mientras se inmoviliza un sitio de detección objetivo. Un ejemplo de acondicionamiento es la modificación de la estructura de fosfodiéster de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, intercambio catiónico), que puede ser útil para la eliminación del ensanchamiento de pico debido a una heterogeneidad en los cationes enlazados por unidad de nucleótido. El contacto de una molécula de ácido nucleico con un agente de alquilación tal como yoduro de alquilo, yodoacetamida, β -yodoetanol, 2,3-epoxi-1-propanol, los enlaces monotio fosfodiéster de una molécula de ácido nucleico se pueden transformar en un enlace fosfotriéster. Del mismo modo, los enlaces fosfodiéster se pueden transformar en derivados no cargados que emplean cloruros de trialkilsililo. El acondicionamiento adicional involucra la incorporación de nucleótidos que reducen la sensibilidad por despurinización (fragmentación durante la MS) tal como nucleótidos de N7 o N9-deazapurina, o bloques de construcción de ARN o utilizando triésteres de oligonucleótido o incorporando funciones fosforotioato que están alquiladas o empleando imitaciones de oligonucleótidos tales como PNA.

35 Para ciertas aplicaciones, puede ser útil detectar simultáneamente más de un loci (mutado) sobre un fragmento particular de ácido nucleico capturado (sobre un punto de un arreglo) o puede ser útil llevar a cabo un procesamiento paralelo por medio del uso de oligonucleótidos o arreglos miméticos de oligonucleótido sobre diferentes soportes sólidos. Se puede lograr una "multiplexación" por medio de diferentes metodologías. Por ejemplo, se pueden detectar simultáneamente diferentes mutaciones sobre una secuencia objetivo empleando las moléculas detectores correspondientes (sonda) (por ejemplo, oligonucleótidos o miméticos de oligonucleótidos). Sin embargo, las diferencias de peso molecular entre los oligonucleótidos de detección D1, D2 y D3 deben ser lo suficientemente grandes para que sea posible la detección simultánea (multiplexación). Esto se puede lograr ya sea por medio de la secuencia misma (composición o longitud) o por medio de la introducción de grupos funcionales que modifican la masa M1-M3 dentro del oligonucleótido de detección.

40 Los formatos preferidos del espectrómetro de masas para uso en la invención son ionización de desorción láser asistida por matriz (MALDI), electroaspersión (ES), resonancia ciclotrón de iones (ICR) y transformadas de Fourier. Los métodos para realizar la espectrometría de masas son conocidos por aquellos capacitados en la técnica y se describen adicionalmente en *Methods of Enzymology*, vol. 193: "Mass Spectrometry" (JA McCloskey, editor), 1990, Academic Press, Nueva York.

Secuenciación

55 En otras formas de realización preferidas, la determinación de la presencia o ausencia de al menos una actividad de quinasa que incrementa la variación de ácidos nucleicos involucra la secuenciación de al menos una secuencia de ácido nucleico. La secuenciación involucra la secuenciación de una porción o porciones del dominio quinasa de erbB1 que incluye al menos un sitio de variación, y puede incluir una pluralidad de tales sitios. Preferiblemente, la porción es de 500 nucleótidos o menos de longitud, más preferiblemente 100 nucleótidos o menos, y lo más

preferiblemente 45 nucleótidos o menos de longitud. Tal secuenciación se puede llevar a cabo por medio de diferentes métodos reconocidos por aquellos capacitados en la técnica, que incluye el uso de métodos de terminación didesoxi (por ejemplo, utilizando nucleótidos didesoxi marcados con colorantes), minisequenciación, y el uso de métodos espectrométricos de masas.

5 Inmunodetección

En una forma de realización, la determinación de la presencia o ausencia de al menos una actividad de quinasas que incrementa la variación de ácidos nucleicos involucra la determinación del estado de activación de objetivos secuencia abajo del EGFR.

10 Los inventores de la presente solicitud han comparado el estado de fosforilación de la mayoría de los objetivos secuencia abajo del EGFR. Por ejemplo, se ha examinado la activación inducida por EGF de Erk1 y Erk2, a través de Ras, de Akt a través de PLC γ /PI3K, y de STAT3 y STAT5 a través de JAK2. Erk1 y Erk2, a través de Ras, Akt a través de PLC γ /PI3K y STAT3 y STAT5 a través de JAK2 son rutas esenciales secuencia abajo que median los efectos oncogénicos del EGFR (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003)).

15 Los inventores de la presente solicitud han mostrado que la activación de Erk inducida por EGF es indistinguible entre las células que expresan EGFR de tipo silvestre o cualquiera de los dos que activan los mutantes del EGFR.

20 En contraste, la fosforilación tanto de Akt como de STAT5 fue sustancialmente elevada en células que expresan cualquiera de los EGFR mutantes. Se observó en forma similar una mayor fosforilación de STAT3 en células que expresan los EGFR mutantes. Por lo tanto, la autofosforilación selectiva inducida por EGF de los residuos de tirosina del terminal C dentro de los mutantes del EGFR está bien correlacionada con la activación selectiva de las rutas de señalización secuencia abajo.

25 La presencia de mutaciones del EGFR se puede determinar utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, técnicas de anticuerpos tales como inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, barrido para FACS, inmunotransferencias, radioinmunoensayos, transferencia tipo Western, inmunoprecipitación, ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), y técnicas de derivación que hacen uso de anticuerpos dirigidos contra objetivos activados secuencia abajo del EGFR. Los ejemplos de tales objetivos incluyen, por ejemplo, STAT3 fosforilado, STAT5 fosforilado, y Akt fosforilado. Utilizando anticuerpos fosfo-específicos, se puede determinar el estado de activación de STAT3, STAT5, y Akt. La activación de STAT3, STAT5, y Akt es útil como un indicador de diagnóstico de la activación de mutaciones del EGFR.

30 La presencia de STAT5, STAT3, o Akt activados (fosforilados) indica que un tratamiento dirigido al EGFR es probable que sea efectivo.

La invención proporciona un método de cribado para variantes en el dominio quinasas del gen *erbB1* en una muestra biológica de prueba por medio de métodos inmunohistoquímicos o inmunocitoquímicos.

35 Se pueden utilizar, por ejemplo, técnicas inmunohistoquímicas ("IHC") e inmunocitoquímicas ("ICC"). IHC es la aplicación de inmunocitoquímica a secciones de tejido, mientras que ICC es la aplicación de inmunocitoquímica a impresiones de células o tejidos después de que han sido objeto de preparaciones citológicas específicas, tales como, por ejemplo, preparaciones en base líquida. La inmunocitoquímica es una familia de técnicas basadas en el uso de un anticuerpo específico, en donde se utilizan anticuerpos para moléculas específicamente objetivo dentro o sobre la superficie de las células. El anticuerpo contiene típicamente un marcador que experimentará una reacción bioquímica, y por lo tanto experimenta un cambio de color, por el encuentro con las moléculas objetivo. En algunos casos, la amplificación de la señal puede estar integrada en el protocolo particular, en donde un anticuerpo secundario, que incluye la mancha del marcador, sigue a la aplicación de un anticuerpo específico primario.

40 Los ensayos de inmunohistoquímica son conocidos por aquellos capacitados en la técnica (por ejemplo, véase Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)).

45 Los anticuerpos, policlonales o monoclonales, pueden ser adquiridos a una variedad de proveedores comerciales, o pueden ser fabricados utilizando métodos bien conocidos, por ejemplo, como se describe en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, 2^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988). En general, los ejemplos de anticuerpos útiles en la presente invención incluyen anticuerpos anti-fosfo-STAT3, anti-fosfo-STAT5, y anti-fosfo-Akt. Tales anticuerpos pueden ser adquiridos, por ejemplo, a través de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), New England Biolabs (Beverly, MA), NeoMarkers (Fremont, CA).

50 Por lo general, para inmunohistoquímica, se obtienen secciones de tejido de un paciente y se fijan por medio de un agente de fijación adecuado, tal como alcohol, acetona, y paraformaldehído, con el cual se hace reaccionar un

anticuerpo. Los métodos convencionales para inmunohistoquímica se describen en Harlow y Lane (eds) (1988) En "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Ausbel et al., (eds) (1987), en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (Nueva York, Nueva York). Las muestras biológicas apropiadas para tales ensayos de detección incluyen, pero no se limitan a, células, biopsias de tejido, sangre entera, plasma, suero, esputo, fluido cerebro espinal, aspirados de mama, líquido pleural, orina y similares.

Para las técnicas de marcación directa, se utiliza un anticuerpo marcado. Para las técnicas de marcación indirecta, se hace reaccionar adicionalmente la muestra con una sustancia marcada.

Alternativamente, se puede utilizar inmunocitoquímica. En general, las células se obtienen de un paciente y se fijan por medio de un agente de fijación adecuado, tal como alcohol, acetona, y paraformaldehído, con el cual se hace reaccionar un anticuerpo. Los métodos de coloración inmunocitológica de muestras humanas son conocidos por aquellos capacitados en el arte y están descritos, por ejemplo, en Brauer et al., 2001 (FASEB J, 15, 2689-2701), Smith-Swintosky et al., 1997.

Los métodos inmunológicos son ventajosos ya que requieren únicamente pequeñas cantidades de material biológico. Tales métodos pueden ser desarrollados a nivel celular y por lo tanto requieren como mínimo una célula. Preferiblemente, se obtienen diferentes células de un paciente afectado con o en riesgo de desarrollar cáncer y se evalúan de acuerdo con los métodos.

Otros métodos de diagnóstico

Un agente para detectar la proteína del EGFR mutante es un anticuerpo capaz de enlazarse a la proteína del EGFR mutante, preferiblemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, F_{ab} o $F_{(ab)2}$). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar el etiquetado directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, enlazamiento físico) de una sustancia detectable con la sonda o anticuerpo, así como marcación indirecta de la sonda o anticuerpo por reacción con otro reactivo que está marcado directamente. Ejemplos de marcación indirecta incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado en forma fluorescente y marcación final de una sonda de ADN con biotina de manera que pueda ser detectada con estreptavidina marcada en forma fluorescente. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un individuo, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Es decir, se puede utilizar el método de detección para detectar ARNm mutante del EGFR, proteína, o ADN genómico en una muestra biológica in vitro así como in vivo. Por ejemplo, las técnicas in vitro para la detección de ARNm mutante del EGFR incluyen hibridaciones tipo Northern e hibridaciones in situ. Las técnicas in vitro para la detección de proteína del EGFR mutante incluyen ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (los ELISA), transferencias tipo Western, inmunoprecipitaciones, e inmunofluorescencia. Las técnicas in vitro para detección de ADN genómico mutante del EGFR incluyen hibridaciones tipo Southern. Además, las técnicas in vivo para detección de proteína del EGFR mutante incluyen la introducción en un individuo de un anticuerpo marcado de proteína anti-EGFR mutante. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser marcado con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un individuo se puede detectar mediante técnicas estándar de formación de imágenes.

En una forma de realización, la muestra biológica contiene moléculas de proteína del individuo de prueba. Alternativamente, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del individuo de prueba o moléculas de ADN genómico del individuo de prueba.

En otra forma de realización, los métodos involucran además la obtención de una muestra biológica de control de un individuo de control, poniendo en contacto la muestra de control con un compuesto o agente capaz de detectar proteína del EGFR mutante, ARNm, o ADN genómico, de tal manera que se detecta la presencia de proteína del EGFR mutante, ARNm o ADN genómico en la muestra biológica, y se compara la presencia de proteína del EGFR mutante, ARNm o ADN genómico en la muestra de control con la presencia de proteína del EGFR mutante, ARNm o ADN genómico en la muestra de prueba.

En una forma diferente de realización, el ensayo diagnóstico es para actividad del EGFR mutante. En una forma de realización específica, la actividad del EGFR mutante es una actividad de tirosina quinasa. El ensayo diagnóstico es para detectar fosforilación mediada por EGFR de al menos un sustrato del EGFR. Los niveles de actividad del EGFR se pueden evaluar, por ejemplo, para diferentes polipéptidos del EGFR mutante, diferentes tejidos que contienen EGFR mutante, biopsias de tejidos cancerosos que se sospecha que tengan al menos un EGFR mutante, y similares. Pueden hacerse opcionalmente comparaciones de los niveles de actividad del EGFR en las diferentes células, tejidos o extractos de la misma. En una forma de realización, los altos niveles de actividad del EGFR en tejido canceroso sirven de diagnóstico para cánceres que pueden ser susceptibles de tratamientos con uno o más inhibidores de tirosina quinasa. En formas de realización relacionadas, se pueden determinar los niveles de actividad del EGFR entre muestras de biopsias tratadas y no tratadas, líneas celulares, animales transgénicos, o extractos de cualquiera de estos, para determinar el efecto de un tratamiento dado sobre la actividad del EGFR mutante en

comparación con un control no tratado.

Método de tratamiento de un paciente

5 En una forma de realización, la invención proporciona un método para seleccionar un tratamiento para un paciente afectado por o en riesgo de desarrollar cáncer por medio de la determinación de la presencia o ausencia de al menos una actividad de quinasa que incrementa la variación de ácidos nucleicos en el dominio quinasa del gen erbB1. En otra forma de realización, la variación es una pluralidad de variaciones, mediante el cual una pluralidad puede incluir variaciones de uno, dos, tres o más loci de genes.

10 En ciertas formas de realización, la presencia de al menos una variación es indicativa de que el tratamiento será efectivo o bien beneficioso (o más probablemente que sea beneficioso) en el paciente. La manifestación de que el tratamiento será efectivo significa que la probabilidad un efecto terapéutico beneficioso será mayor que en una persona que no tenga la presencia adecuada de la(s) variación(ones) de ácido nucleico que incrementan la actividad de la quinasa particular en el dominio quinasa del gen erbB1.

15 El tratamiento involucrará la administración de un inhibidor de tirosina quinasa. El tratamiento puede involucrar una combinación de tratamientos, que incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor de tirosina quinasa en combinación con otros inhibidores de tirosina quinasa, quimioterapia, radiación, etc.

20 Por lo tanto, en relación con la administración de un inhibidor de tirosina quinasa, un fármaco que sea "efectivo contra" un cáncer indica que la administración en una forma clínicamente apropiada da como resultado un efecto beneficioso para al menos una fracción de pacientes estadísticamente significativa, tal como una mejoría de los síntomas, una cura, una reducción en la carga de la enfermedad, una reducción en la masa o en el número de células del tumor, prolongación de la vida, una mejoría en la calidad de vida, u otro efecto generalmente reconocido como positivo por parte de los médicos familiarizados con el tratamiento del tipo particular de enfermedad o condición.

25 En una forma de realización preferida, el compuesto es una anilinoquinazolina o anilinoquinazolina sintética. La publicación de la patente europea No. 0566226 divulga anilinoquinazolinas que tienen actividad contra la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). También se sabe a partir de las solicitudes de patente europeas números 0520722 y 0566226 que ciertos derivados de 4-anilinoquinazolina son útiles como inhibidores de tirosina quinasa del receptor. Las relaciones muy estrechas de la actividad con la estructura mostradas por estos compuestos sugieren un modo de enlazamiento claramente definido, en donde el anillo de quinazolina se enlaza en el bolsillo de adenina y el anillo anilino se enlaza en un bolsillo lipofílico único adyacente.

30 Se han evaluado clínicamente tres análogos de 4-anilinoquinazolina (dos inhibidores reversibles y uno irreversible) como compuestos farmacéuticos contra el cáncer. Denny, *Farmaco* enero - febrero 2001; 56 (1 - 2): 51 - 6. Alternativamente, el compuesto es EKB-569, un inhibidor de quinasa del receptor de EGF (Torrance et al., *Nature Medicine*, vol. 6, No. 9, septiembre de 2000, página 1024). En una forma de realización más preferida, el compuesto es gefitinib (IRESSA®) o erlotinib (TARCEVA®).

35 El tratamiento dirigido a las células cancerosas que contienen al menos un EGFR mutante descrito aquí puede ser administrado solo o en combinación con cualquier otro tratamiento apropiado contra el cáncer y / o agente terapéutico conocido por alguien capacitado en el arte. Existe un tratamiento de una patología, tal como un cáncer, que comprende administrar a un individuo que requiera del mismo cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto que inhibe la actividad de quinasa del EGFR, tales como gefitinib, erlotinib, etc., administrados solos o en

40 combinación con al menos otro agente o terapia contra el cáncer. La inhibición de proteína quinasa activadas a través del uso de compuestos farmacéuticos de moléculas pequeñas específicas o de estrategias basadas en anticuerpos se ha convertido en un enfoque efectivo como terapia contra el cáncer. Véase, por ejemplo, G. D. Demetri et al., *N. Engl. J. Med.* 347, 472 (2002); B. J. Druker et al., *N. Engl. J. Med.* 344, 1038 (2001); D. J. Slamon et al., *N. Engl. J. Med.* 344, 783 (2001).

45 En una forma de realización, el agente contra el cáncer es al menos un agente quimioterapéutico. En una forma de realización relacionada, el agente contra el cáncer es al menos una radioterapia. En una variante de una forma de realización, la terapia contra el cáncer es una terapia antiangiogénica (por ejemplo, endostatina, angiostatina, TNP-470, caplostatina (Stachi-Fainaro et al., *Cancer Cell* 7 (3), 251 (2005)).

50 Los agentes terapéuticos pueden ser iguales o diferentes, y pueden ser, por ejemplo, radionucleidos terapéuticos, fármacos, hormonas, antagonistas de hormonas, antagonistas de receptores, enzimas o proenzimas activadas por otro agente, autocrinas, citoquinas o cualquier agente adecuado contra el cáncer conocido por aquellos capacitados en la técnica. En una forma de realización, el agente contra el cáncer es avastina, un anticuerpo anti-VEGF probado exitosamente en terapia antiangiogénica del cáncer tanto contra cánceres sólidos y como contra neoplasias hematológicas. Véase, por ejemplo, Ribatti et al., 2003 *J Hematother Stem Cel Res.* 12 (1), 11-22. También se

55 pueden utilizar toxinas en los métodos de la presente invención. Otros agentes terapéuticos útiles en la presente

invención incluyen anti-ADN, anti-ARN, oligonucleótidos marcados radiactivamente, tales como oligonucleótidos antisentido, agentes citotóxicos o antimicrobiano anti-proteína y anti-cromatina. Otros agentes terapéuticos son conocidos por aquellos capacitados en el arte, y se contempla específicamente el uso de tales otros agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención.

5 El agente antitumoral puede ser uno entre numerosos agentes quimioterapéuticos tales como un agente alquilante, un antimetabolito, un agente hormonal, un antibiótico, un anticuerpo, un compuesto biológico contra el cáncer, Gleevec, colchicina, un alcaloide de la vinca, L-asparaginasa, procarbazona, hidroxiurea, mitotano, nitrosoureas o una imidazol carboxamida. Agentes adecuados son aquellos agentes que promueven la despolarización de tubulina o prohíben la proliferación de células tumorales. Los agentes quimioterapéuticos contemplados dentro del alcance
10 de la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes contra el cáncer enumeradas en el Orange Book of Approved Drug Products With Therapeutic Equivalence Evaluations, como los recopilados por la Administración de Alimentos y Medicamentos y el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, carboplatino y paclitaxel. Los tratamientos dirigidos a la actividad de la quinasa del EGFR también se pueden administrar con un tratamiento de terapia por radiación. Se contemplan
15 tratamientos adicionales contra el cáncer conocidos en el arte dentro del alcance de la invención.

El agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos son conocidos en la técnica e incluyen al menos los taxanos, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, alcaloides de la vinca, antibióticos, enzimas, complejos de coordinación de platino, urea sustituida, derivados de metil hidracina, supresores
20 adrenocorticales, o antagonistas. Más específicamente, los agentes quimioterapéuticos pueden ser uno o más agentes escogidos del grupo no limitante de esteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógenos, o andrógenos. Aún más específicamente, los agentes quimioterapéuticos pueden ser azaribina, bleomicina, briostatina-1, busulfán, carmustina, clorambucilo, carboplatino, cisplatino, CPT-11, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, dexametasona, dietilestilbestrol, doxorubicina, etinil estradiol, etopósido, fluorouracilo, flouximesterona, gemcitabina, caproato de hidroxiprogesterona, hidroxiurea, L-asparaginasa, leucovorina, lomustina, mecloretamina, acetato de medroprogesterona, acetato de megestrol, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitotano, paclitaxel, butirato de fenilo, prednisona, procarbazona, semustina estreptozocina, tamoxifeno, taxanos, taxol, propionato de testosterona, talidomida, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinblastina, o vincristina. También se contempla el uso de cualquiera de las combinaciones de agentes
25 quimioterapéuticos. La administración del agente quimioterapéutico puede hacerse antes, durante o después de la administración de un tratamiento dirigido a la actividad del EGFR.

Otros agentes terapéuticos adecuados se seleccionan del grupo que consiste de radioisótopo, adición de boro, inmunomodulador, toxina, agente fotoactivo o colorante, compuesto farmacéutico quimioterapéutico contra el cáncer, compuesto farmacéutico antiviral, compuesto farmacéutico contra hongos, compuesto farmacéutico antibacteriano, compuesto farmacéutico contra protozoarios y agente quimiosensibilizador (véanse, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.925.648 y 4.932.412). Se describen agentes quimioterapéuticos adecuados en Remington's
35 Pharmaceutical Sciences, 19^a edición. (Mack Publishing Co., 1995), y en The Pharmacological Basis of Therapeutics de Goodman y Gilman (Goodman et al., Eds. Macmillan Publishing Co., New York, ediciones 1980 y 2001). Otros agentes quimioterapéuticos adecuados, tales como compuestos farmacéuticos experimentales, son conocidos por aquellos capacitados en el arte. Por otra parte, se selecciona un radioisótopo terapéutico adecuado del grupo que consiste de emisores α , emisores β , emisores γ , emisores de electrones Auger, agentes de captura de neutrones que emiten partículas α y radioisótopos que decaen por la captura de electrones. Preferiblemente, se selecciona el radioisótopo del grupo que consiste de 225Ac, 198Au, 32P, 125I, 131I, 90Y, 186Re, 188Re, 67Cu, 177Lu, 213Bi, 10B, y 211At.

45 Cuando se utiliza más de un agente terapéutico, pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, los agentes terapéuticos pueden incluir diferentes radionucleidos, o un compuesto farmacéutico y un radionucleido. En una forma de realización preferida, el tratamiento dirigido a la actividad del EGFR inhibe la actividad de quinasa del EGFR mutante.

50 En otra forma de realización, se utilizan diferentes isótopos que son efectivos en diferentes distancias como resultado de sus emisiones individuales de energía como primero y segundo agentes terapéuticos. Tales agentes pueden ser utilizados para lograr un tratamiento más efectivo de los tumores, y son útiles en pacientes que presentan múltiples tumores de diferentes tamaños, como en circunstancias clínicas normales.

Pocos de los isótopos disponibles son útiles para el tratamiento de depósitos tumorales muy pequeños y células individuales. En estas situaciones, un compuesto farmacéutico o toxina pueden ser un agente terapéutico más útil.
55 En consecuencia, en formas de realización preferidas de la presente invención, se utilizan isótopos en combinación con especies no isotópicas tales como compuestos farmacéuticos, toxinas, y agentes de captura de neutrones. Se conocen muchos compuestos farmacéuticos y toxinas que tienen efectos citotóxicos sobre las células, y pueden ser utilizados en conexión con la presente invención. Se encuentran en compendios de compuestos farmacéuticos y

toxinas, tales como el Merck Index, Goodman y Gilman, y similares, y en las referencias citadas anteriormente.

Los compuestos farmacéuticos que interfieren con la síntesis de proteína intracelular también pueden ser utilizados en los métodos de la presente invención; tales compuestos farmacéuticos son conocidos por aquellos capacitados en el arte e incluyen puromicina, cicloheximida y ribonucleasa.

- 5 Los métodos terapéuticos permitidos por la invención pueden ser utilizados para terapia contra el cáncer. Se sabe bien que los radioisótopos, los compuestos farmacéuticos y las toxinas se pueden conjugar con anticuerpos o con fragmentos de anticuerpos que se enlazan específicamente con marcadores que son producidos por o están asociados con células cancerosas, y que tales conjugados de anticuerpo pueden ser usados para dirigir los radioisótopos, compuestos farmacéuticos o toxinas a los sitios tumorales para mejorar su eficacia terapéutica y
- 10 minimizar los efectos secundarios. Ejemplos de estos agentes y métodos son revisados en un Wawrzynczak y Thorpe (en *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, L. M. Franks y N. M. Teich, eds. capítulo 18, páginas 378 - 410, Oxford University Press. Oxford, 1986), en *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel, ed., 3 - 300, Oxford University Press, N.Y., 1987), en Dillman, R. O. (*CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1: 357, CRC Press, Inc., 1984), en Pastan et al., (*Cell* 47: 641, 1986). En Vitetta et al., (*Science* 238: 1098 - 1104, 1987) y en Brady et al., (*Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 13: 1535 - 1544, 1987). Otros ejemplos del uso de inmunoconjugados para el cáncer y otras formas de terapia han sido divulgados, entre otros, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.331.647, 4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.460.459, 4.460.561, 4.624.846, 4.818.709, 4.046.722, 4.671.958, 4.046.784, 5.332.567, 5.443.953, 5.541.297, 5.601.825, 5.635.603, 5.637.288, 5.677.427, 5.686.578, 5.698.178, 5.789.554, 5.922.302, 6.187.287, y 6.319.500.

- Adicionalmente, se pueden utilizar los métodos de tratamiento en combinación con otros compuestos o técnicas para prevenir, mitigar o revertir los efectos secundarios de ciertos agentes citotóxicos. Los ejemplos de tales combinaciones incluyen, por ejemplo, la administración de IL-1 junto con un anticuerpo para rápida eliminación, como se describe, por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos No. 4.624.846. Tal administración se puede
- 25 realizar de 3 a 72 horas después de la administración de un tratamiento terapéutico primario dirigido a la actividad del EGFR en combinación con un agente contra el cáncer (por ejemplo, con un radioisótopo, compuesto farmacéutico o toxina como el componente citotóxico). Esto se puede utilizar para mejorar la eliminación del conjugado, el compuesto farmacéutico o la toxina del torrente sanguíneo y para mitigar o revertir la toxicidad mieloide y otra toxicidad hematopoyético causada por el agente terapéutico.

- 30 En otro método permitido por la invención, la terapia contra el cáncer puede involucrar una combinación de más de un agente tumoricida, por ejemplo, un compuesto farmacéutico y un radioisótopo, o un radioisótopo y un agente de boro 10 para terapia activada por neutrones, o un compuesto farmacéutico y un modificador de respuesta biológica, o un conjugado de moléculas de fusión y un modificador de respuesta biológica. Se puede integrar la citoquina en tal régimen terapéutico para maximizar la eficacia de cada componente de la misma.

- 35 En forma similar, ciertos anticuerpos contra la leucemia y contra linfoma conjugados con radioisótopos que son emisores β o α pueden inducir efectos secundarios mieloides y otros efectos secundarios hematopoyéticos cuando estos agentes no están dirigidos únicamente a las células tumorales. Esto se observa particularmente cuando las células tumorales están en el torrente sanguíneo y en los órganos que forma la sangre. Se prefiere la administración concomitante y / o posterior de al menos una citoquina hematopoyética (por ejemplo, factores de crecimiento, tales como factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF y GM-CSF) para reducir o mejorar los efectos secundarios hematopoyéticos, aumentando al mismo tiempo los efectos contra el cáncer.
- 40

- Se conoce bien en el arte que se pueden utilizar diferentes métodos de terapia con radionucleidos para el tratamiento del cáncer y otras condiciones patológicas, como se describe, por ejemplo, en Harbert, "Nuclear Medicine Therapy", Nueva York, Thieme Medical Publishers, 1987, páginas 1-340. Un médico experimentado en estos procedimientos será capaz de adaptar fácilmente la terapia adyuvante de citoquina descrita aquí a tales procedimientos para mitigar cualquiera de los efectos secundarios hematopoyéticos de los mismos. En forma similar, se puede utilizar una terapia con compuestos farmacéuticos citotóxicos, administrada con el tratamiento dirigido a la actividad del EGFR, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer o de otras enfermedades proliferativas celulares. Tal tratamiento está gobernado por medio de principios análogos a los de la terapia de radioisótopos con isótopos o anticuerpos marcados en forma radioactiva. El médico ordinariamente capacitado será capaz de adaptar la administración de la terapia adicional contra el cáncer durante y / o después de la terapia primaria contra el cáncer.
- 45
- 50

Kits

- Por consiguiente, la presente invención permite kits predictivos, de diagnóstico, y de pronóstico que comprenden cebadores degenerados para amplificar un ácido nucleico objetivo en el dominio quinasa del gen erbB1 e instrucciones que incluyen la amplificación del protocolo y el análisis de los resultados. El kit también puede incluir
- 55
- alternativamente amortiguadores, enzimas, y contenedores para llevar a cabo la amplificación y el análisis de los

productos de la amplificación. El kit también puede ser un componente de un kit de cribado, diagnóstico o pronóstico que incluye otras herramientas tales como microarreglos de ADN. Preferiblemente, el kit también proporciona una o más plantillas de control, tales como ácidos nucleicos aislados de una muestra de tejido normal, y / o una serie de muestras que representan diferentes variaciones en el dominio quinasa del gen erbB1.

- 5 En una forma de realización, el kit proporciona dos o más pares de cebadores, cada par capaz de amplificar una región diferente del gen erbB1 (cada región un sitio de variación potencial) proporcionando por lo tanto un kit para análisis de la expresión de diferentes variaciones de los genes en una muestra biológica en una reacción o en varias reacciones paralelas.

- 10 Los cebadores en los kits pueden ser marcados, por ejemplo marcados en forma fluorescente, para facilitar la detección de los productos de la amplificación y el análisis consecuente de las variaciones de ácido nucleico.

En una forma de realización, se puede detectar más de una variación en un análisis. Un kit de combinación incluirá por lo tanto cebadores capaces de amplificar diferentes segmentos del dominio quinasa del gen erbB1. Los cebadores pueden ser marcados en forma diferencial, por ejemplo, utilizando diferentes marcadores fluorescentes, para diferenciar entre las variaciones.

- 15 Los cebadores contenidos en el kit pueden incluir los siguientes cebadores: cebador sentido del Exón 19, 5'-GCAATATCAGCCTTAGSTGCGGCTC-3' (SEQ ID No: 505), cebador antisentido del exón 19, 5'-CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG-3' (SEQ ID No: 506); cebador sentido del exón 21, 5'-CTAACGTTGCCAGCCATAAGTC-3' (SEQ ID No: 507) y cebador antisentido del exón 21, 5'-GCTGCGAGCTACCCAGAATGTCTGG-3' (SEQ ID No: 508).

- 20 En una forma de realización preferida, se seleccionan los cebadores del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 646 a 673 (véanse las Tablas 5 y 6). Estos cebadores tienen la SEQ ID No. 645 sobre el extremo 5' del cebador hacia adelante y la SEQ ID No. 674 en el extremo 5' de los cebadores inversos.

Kits de inmunodetección

- 25 En formas de realización adicionales, la invención permite kits inmunológicos para uso en la detección de los niveles de activación de los objetivos del EGFR secuencia abajo (es decir, STAT3, STAT5, y Akt). Tales kits generalmente contendrán uno o más anticuerpos que tienen inmunoespecificidad para la forma fosforilada de STAT3, STAT5, o Akt.

- 30 Un kit que comprende un anticuerpo capaz de enlazarse en forma inmunoespecífica a una proteína fosforilada en una célula de mamífero seleccionada del grupo que consiste de proteínas Akt, STAT3, y STAT5 fosforiladas e instrucciones para el uso del anticuerpo para examinar la célula de mamífero para la activación de la ruta de Akt, STAT3 o STAT5 es permitida por la presente invención. En métodos preferidos, el kit comprende diferentes anticuerpos, cada uno de los cuales es capaz de enlazarse inmunoespecíficamente con proteínas fosforiladas en una célula de mamífero seleccionada del grupo que consiste de proteínas Akt, STAT3, STAT5 fosforiladas.

- 35 El kit comprende, en general, a) un vehículo farmacéuticamente aceptable; b) un anticuerpo dirigido contra STAT3, STAT5, o Akt fosforilados, en un medio contenedor adecuado; y c) un reactivo de inmunodetección. Los anticuerpos (monoclonales o policlonales) se encuentran disponibles comercialmente y también se pueden preparar por medio de métodos conocidos por aquellos capacitados en la técnica, por ejemplo, en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, 2001.

- 40 En ciertas formas de realización, el antígeno o el anticuerpo puede estar unido a un soporte sólido, tal como una matriz de columna o pozo de una placa de microtitulación. Los reactivos de inmunodetección del kit pueden adoptar cualquiera de una variedad de formas, incluyendo aquellas etiquetas detectables que se asocian con, o que se enlazan con, el anticuerpo dado o antígeno mismo. También se contemplan las etiquetas detectables que se asocian con o que se unen a un ligando de enlazamiento secundario. Ejemplos de ligandos secundarios son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de enlazamiento por el primer anticuerpo o antígeno.

- 50 Los marcadores de ensayo adecuados son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa, radioisótopos, tales como yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (^{115m}In, ^{113m}In, ¹¹²In, ¹¹¹In), y tecnecio (⁹⁹Tc, ^{99m}Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹¹³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru; etiquetas luminiscentes tales como luminol; y etiquetas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Otros reactivos de inmunodetección adecuados para uso en los presentes kits incluyen el reactivo de dos

componentes que comprende un anticuerpo secundario que tiene afinidad de enlazamiento por el primer anticuerpo o antígeno, junto con un tercer anticuerpo que tiene afinidad de enlazamiento por el segundo anticuerpo, en donde el tercer anticuerpo se enlaza a un marcador detectable.

- 5 Se conocen una cantidad de ejemplos de etiquetas o marcadores en la técnica y todas estas etiquetas se puede emplear en conexión con la presente invención. Los marcadores radiactivos, los isótopos de resonancia de espín magnético nuclear, etiquetas fluorescentes y etiquetas de enzimas capaces de generar un producto coloreado tras el contacto con un sustrato apropiado son ejemplos adecuados.

Los kits pueden contener conjugados de etiqueta-anticuerpo, ya sea en forma completamente conjugada, en forma de compuestos intermedios, o como fracciones separadas para ser conjugados por el usuario del kit.

- 10 Los kits pueden incluir además una composición adecuada en alícuotas de un antígeno ya sea marcado o no marcado, tal como se puede utilizar para preparar una curva estándar para un ensayo de detección o como un control positivo.

- 15 Los kits, independientemente del tipo, generalmente incluirán uno o más contenedores en los cuales se colocan los agentes biológicos y, preferiblemente, en alícuotas adecuadas. Los componentes de los kits pueden empacarse o bien en medio acuoso o en forma liofilizada.

- 20 Los kits de inmunodetección pueden contener adicionalmente uno o más de una variedad de otros anticuerpos o antígenos marcadores de cáncer, si así se desea. Tales kits podrían por lo tanto proporcionar un panel de marcadores de cáncer, que pueden ser utilizados mejor en las pruebas de una variedad de pacientes. A modo de ejemplo, dichos marcadores adicionales podrían incluir, otros marcadores tumorales, tales como PSA, SeLe (X), HCG, así como p53, D1 cíclico, p16, tirosinasa, MAGE, BAGE, PAGE, MUC18, CEA, p27, [bgr]HCG u otros marcadores conocidos por aquellos capacitados en la técnica.

- 25 El medio contenedor de los kits, generalmente, incluirá al menos un vial, un tubo de ensayo, un matraz, una botella, o incluso una jeringa u otro medio contenedor, en el que se pueden colocar el anticuerpo o el antígeno, y preferiblemente, en forma de alícuotas adecuadas. Cuando se proporciona un segundo o un tercer ligando de enlazamiento o un componente adicional, el kit también contendrá generalmente un segundo, un tercer u otro contenedor adicional en el que se puede colocar este ligando o componente.

Los kits también incluirán típicamente un medio para contener el anticuerpo, el antígeno, y cualesquiera otros contenedores de reactivos en un confinamiento cerrado para la venta comercial. Estos contenedores pueden incluir contenedores plásticos moldeados por inyección o por soplado en los que se mantienen los viales deseados.

- 30 Los métodos permitidos por la presente invención también abarcan la identificación de compuestos que interfieren con la actividad de la quinasa de una forma variante del EGFR. El EGFR variante comprende al menos una variación en su dominio quinasa. Tales compuestos pueden, por ejemplo, ser inhibidores de la tirosina quinasa. Los métodos para la identificación de compuestos que interfieren con la actividad de la quinasa de un receptor son generalmente conocidos por aquellos capacitados en la técnica y se describen adicionalmente, por ejemplo, en
 35 Dhanabal et al., Cancer Res. 59: 189 - 197 (1999); Xin et al., J. Biol., Chem., 274: 9116 - 9121 (1999); Sheu et al., Anticancer Res. 18: 4435 - 4441; Ausprunk et al., Dev. Biol., 38: 237 - 248 (1974); Gimbrone et al., J. Natl. Cancer Inst. 52: 413 - 427; Nicosia et al., In vitro 18: 538 - 549. En general, se identifican los compuestos, usando los métodos divulgados en este documento, que interfieren con la actividad mejorada característica de la quinasa de al menos una variación en el dominio quinasa del gen erbB1.

- 40 Soporte sólido

En otra forma de realización, la invención permite un kit para la práctica de los métodos de la invención. En una forma de realización, se describe un kit para la detección de variaciones en el dominio quinasa del gen erbB1 en un soporte sólido. El kit puede incluir, por ejemplo, los materiales y reactivos para la detección de una pluralidad de variaciones en un ensayo. El kit puede incluir por ejemplo, un soporte sólido, cebadores de oligonucleótidos para un
 45 conjunto específico de polinucleótidos objetivo, reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa y componentes, por ejemplo, enzimas para la síntesis de ADN, materiales marcadores, y otros amortiguadores y reactivos para el lavado. El kit también puede incluir instrucciones para uso del kit para amplificar objetivos específicos sobre un soporte sólido. Cuando el kit contiene un soporte sólido preparado que tiene un conjunto de cebadores ya fijados sobre el soporte sólido, por ejemplo, para la amplificación de un conjunto particular de polinucleótidos objetivo, el diseño y la construcción de tal soporte sólido preparado se describió anteriormente. El kit también incluye reactivos necesarios para la realización de una PCR sobre un soporte sólido, por ejemplo utilizando un procedimiento de PCR de tipo de fase sólida o del tipo in situ, donde el soporte es capaz de amplificación por PCR usando un máquina de PCR de tipo in situ. Los reactivos de PCR, incluidos en el kit, incluyen los amortiguadores de PCR habituales, una polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq ADN polimerasa), nucleótidos

(por ejemplo, los dNTP), y otros componentes y moléculas de marcación (por ejemplo, para marcación directa o indirecta tal como se describe más arriba). Los kits se pueden ensamblar para apoyar la práctica del método de amplificación por PCR utilizando cebadores inmovilizados solos o, alternativamente, junto con los cebadores en fase de solución.

- 5 Alternativamente, el kit puede incluir un soporte sólido con oligonucleótidos específicos fijados a cualquier cantidad de variaciones del EGFR, que se definen adicionalmente en las Figuras 4A - 4C y en las Figuras 7 y 8. Se puede aplicar una muestra biológica de prueba al soporte sólido, bajo condiciones de hibridación selectivas, para la determinación de la presencia o ausencia de variaciones en el dominio quinasa de erbB1.

- 10 Los métodos permitidos de la presente invención también abarcan la identificación de compuestos que interfieren con la actividad de la quinasa de una forma variante del EGFR. El EGFR variante comprende al menos una variación en su dominio quinasa. Sin embargo, en una forma de realización alternativa, el EGFR variante comprende una mutación secundaria que confiere resistencia a una primera TKI por ejemplo, gefitinib o erlotinib. Tales compuestos pueden, por ejemplo, ser inhibidores de la tirosina quinasa. Los métodos para la identificación de compuestos que interfieren con la actividad de la quinasa de un receptor son generalmente conocidos por aquellos capacitados en la técnica y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Dhanabal et al., Cancer Res. 59: 189 - 197 (1999); Xin et al., J. Biol. Chem. 274: 9116 - 9121 (1999); Sheu et al., Anticancer Res. 18: 4435 - 4441; Ausprunk et al., Dev. Biol. 38: 237 - 248 (1974); Gimbrone et al., J. Natl. Cancer Inst. 52: 413 - 427; Nicosia et al., In vitro 18: 538 - 549. En general, se identifican compuestos, usando los métodos divulgados en este documento, que interfieren con la actividad mejorada característica de la quinasa de al menos una variación en el dominio quinasa del gen erbB1.
- 20 Tales variaciones conocidas se describen en las Figuras 4, 7, 8 y en la Tabla 2.

Una vez identificados, tales compuestos se administran a los pacientes que requieran de tratamiento dirigido al EGFR, por ejemplo, los pacientes afectados con o en riesgo de desarrollar cáncer.

- 25 La vía de administración puede ser intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutánea (SC), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP), intratecal (IT), intrapleurales, intrauterina, rectal, vaginal, tópica, intratumoral y similares. Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía parenteral mediante inyección o por infusión gradual en el tiempo y pueden ser suministrados por medio peristáltico.

- 30 La administración puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan penetrantes apropiados para permear la barrera en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, pueden usarse detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede ser a través de aerosoles nasales, por ejemplo, o usando supositorios. Para la administración oral, los compuestos de la invención se formulan en formas de administración oral convencionales tales como cápsulas, comprimidos y tónicos.

- 35 Para la administración tópica, la composición farmacéutica (inhibidor de la actividad de la quinasa) se formula en pomadas, ungüentos, geles, o cremas, como se conoce generalmente en la técnica.

- 40 Las composiciones terapéuticas de esta invención se administran convencionalmente por vía intravenosa, como mediante inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. El término "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para el individuo, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el diluyente requerido, es decir, el portador, o vehículo.

- 45 Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de la dosificación, y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad a administrar y el momento dependen del sujeto a tratar, de la capacidad del sistema del individuo para utilizar el ingrediente activo, y del grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para ser administradas dependen del juicio del médico tratante y son particulares para cada individuo.

- 50 Los inhibidores de tirosina quinasa útiles para la práctica de los métodos de la presente invención se describen en este documento. Se puede utilizar cualquier formulación o sistema de suministro de fármacos que contengan los ingredientes activos, que sea adecuada para el uso previsto, como generalmente las conocen aquellos capacitados en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración oral, rectal, tópica o parenteral (incluyendo inhalación, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa) son conocidos por aquellos capacitados en la técnica. El vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor de los mismos.

Como se usa en este documento, los términos, "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y

variaciones gramaticales de los mismos, como se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se utilizan de manera intercambiable y significa que los materiales pueden ser administrados a o sobre un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseables.

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

10 Para la administración enteral, se puede incorporar un compuesto en un vehículo inerte en unidades discretas tales como cápsulas, tabletas, comprimidos o pastillas, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del compuesto activo; como un polvo o gránulos; o una suspensión o solución en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso, por ejemplo, un jarabe, un elixir, una emulsión o una poción. Los vehículos adecuados pueden ser almidones o azúcares e incluyen lubricantes, saborizantes, aglutinantes y otros materiales de la misma naturaleza.

15 Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el compuesto activo en una forma de flujo libre, por ejemplo, un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con ingredientes accesorios, por ejemplo, aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, agentes dispersantes o tensoactivos. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto activo en polvo con cualquier vehículo adecuado.

20 Un jarabe o suspensión se puede fabricar añadiendo el compuesto activo a una solución acuosa concentrada de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, a la que también se puede añadir cualquier ingrediente accesorio. Tales ingredientes accesorios pueden incluir saborizantes, un agente para retardar la cristalización del azúcar o un agente para aumentar la solubilidad de cualquier otro ingrediente, por ejemplo, como un alcohol polihídrico, por ejemplo, glicerol o sorbitol.

25 Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con un vehículo convencional, por ejemplo, manteca de cacao o Witepsol S55 (marca registrada de Dynamite Nobel Chemical, Alemania), para una base de supositorio.

30 Las formulaciones para administración oral se pueden presentar con un potenciador. Potenciadores de la absorción por vía oral aceptables incluyen agentes tensoactivos tales como lauril sulfato de sodio, palmitoil carnitina, Laureth-9, fosfatidilcolina, ciclodextrina y derivados de los mismos; sales biliares tales como desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicolato de sodio, y fusidato de sodio, agentes quelantes como EDTA, cítrico ácido y salicilatos; y ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, acilcarnitinas, mono y diglicéridos). Otros potenciadores de la absorción oral incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, CHAPS (3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio-1-propansulfonato), Big-CHAPS (N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-colamida), clorobutanol, octoxinol-9, alcohol bencílico, fenoles, cresoles, y alcoholes de alquilo. Un potenciador de la absorción oral especialmente preferido para la presente invención es lauril sulfato de sodio.

35 Alternativamente, el compuesto puede ser administrado en liposomas o microesferas (o micropartículas). Los métodos para preparar liposomas y microesferas para administración a un paciente son bien conocidos por aquellos capacitados en la técnica. La patente de los Estados Unidos No. 4.789.734, describe procedimientos para encapsular materiales biológicos en liposomas. Esencialmente, el material se disuelve en una solución acuosa, se añaden los fosfolípidos y lípidos apropiados, junto con tensoactivos si se requiere, y el material dializado o sonificado, como, según se requiera. Una revisión de los métodos conocidos es proporcionado por G. Gregoriadis, Capítulo 14, "Liposomes", Drug Carriers in Biology and Medicine, páginas 287 - 341 (Academic Press, 1979).

40 Las microesferas formadas a partir de polímeros o proteínas son bien conocidas para aquellos capacitados en la técnica, y pueden ser adaptadas para pasar a través del tracto gastrointestinal directamente al torrente sanguíneo. Alternativamente, se puede incorporar el compuesto y las microesferas, o se puede implantar la composición de microesferas, para liberación lenta durante un periodo de tiempo que varía de días a meses. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.906.474, 4.925.673 y 3.625.214, y Jein, TIPS 19: 155 - 157 (1998).

45 En una forma de realización, el inhibidor de la tirosina quinasa de la presente invención se pueden formular en un liposoma o micropartícula, que es de tamaño adecuado para alojarse en lechos capilares después de la administración intravenosa. Cuando el liposoma o la micropartícula se aloja en los lechos capilares que rodean el tejido isquémico, los agentes se pueden administrar localmente en el sitio en el que pueden ser más eficaces. Liposomas adecuados para ser dirigidos a tejido isquémico son por lo general aproximadamente menores de 200 nanómetros y también son típicamente vesículas unilamelares, como se divulga, por ejemplo, en la patente de los

Estados Unidos No. 5.593.688 de Baldeschweiler, titulada "Liposomal targeting of ischemic tissue".

5 Las micropartículas preferidas son aquellas preparadas a partir de polímeros biodegradables, tales como poliglicólido, poliláctida y copolímeros de los mismos. Aquellos capacitados en la técnica puede determinar fácilmente un sistema portador apropiado dependiendo de diversos factores, incluyendo la velocidad deseada de liberación del fármaco y la dosificación deseada.

10 En una forma de realización, las formulaciones se administran a través de catéter directamente en el interior de los vasos sanguíneos. La administración puede ocurrir, por ejemplo, a través de los agujeros en el catéter. En aquellas formas de realizaciones en las que los compuestos activos tienen una vida media relativamente larga (del orden de 1 día a una semana o más), las formulaciones se pueden incluir en hidrogeles poliméricos biodegradables, tales como los divulgados en la patente de los Estados Unidos No. 5.410.016 de Hubbell et al. Estos hidrogeles poliméricos pueden ser suministrados en el interior de un lumen de tejido y los compuestos activos liberados con el tiempo a media que el polímero se degrada. Si se desea, los hidrogeles poliméricos pueden tener micropartículas o liposomas que incluyen el compuesto activo dispersado en los mismos, proporcionando otro mecanismo para la liberación controlada de los compuestos activos.

15 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica del campo farmacéutico. Todos los métodos incluyen la etapa de poner el compuesto activo en asociación con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto en forma uniforme e íntima el compuesto activo junto con un vehículo líquido o un vehículo sólido finamente dividido y, a continuación, si es necesario, se conforma el producto en la forma de dosificación unitaria deseada.

20 Las formulaciones pueden incluir además uno o más ingredientes accesorios opcionales utilizados en la técnica de las formulaciones farmacéuticas, por ejemplo, diluyentes, amortiguadores, agentes saborizantes, aglutinantes, agentes activos de superficie, espesantes, lubricantes, agentes de suspensión, conservantes (incluyendo antioxidantes) y similares.

25 Los compuestos de los presentes métodos se pueden presentar para la administración al tracto respiratorio como una sustancia para aspirar o un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solos o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de compuesto activo tienen adecuadamente diámetros de menos de 50 micras, preferiblemente menos de 10 micras, más preferiblemente entre 2 y 5 micras.

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

35 La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en ella se entiende bien en la técnica y no necesita estar limitada con base en la formulación. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensiones en líquido antes de ser usadas. La preparación también se puede emulsionar.

40 El ingrediente activo se puede mezclar con excipientes que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores del pH y similares que mejoran la eficacia del ingrediente activo.

45 El inhibidor de la quinasa de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en el mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2 - etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

50 Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y agua, o contienen un amortiguador tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como

solución salina amortiguada con fosfato. Aún más, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal amortiguadora, así como sales tales como cloruros de sodio y de potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos.

Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y con la exclusión del agua. Ejemplos de tales fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, y emulsiones agua-aceite.

La predicción de mutaciones

En otra forma de realización, la presente invención da a conocer un método para predecir las variaciones en el gen *erbB1* después del tratamiento con un inhibidor de la tirosina quinasa. Es generalmente conocido que la respuesta al tratamiento del cáncer con un inhibidor de la tirosina quinasa es seguido a menudo por la resistencia a ese u otros compuestos similares. Se cree que tal resistencia surge a través de la adquisición de mutaciones en el objetivo del fármaco, por ejemplo, en el EGFR. La capacidad para predecir (y seleccionar) tales mutaciones permitirá obtener mejores opciones de tratamiento y menos recaídas.

En una forma de realización, se aísla y secuencía el ADN que codifica el dominio quinasa del EGFR a partir de una muestra tumoral de pacientes con cáncer que han respondido al gefitinib (o un tratamiento similar dirigido al EGFR) pero han recaído posteriormente. Se espera que la recaída en tales pacientes involucre la adquisición de mutaciones secundarias dentro del dominio quinasa del EGFR. Los compuestos que dirigen, e inhiben la actividad de la quinasa de estas mutaciones recién definidas se identifican luego usando los métodos divulgados en este documento. Tales compuestos se pueden usar solos, o en combinación con otros tratamientos conocidos dirigidos al EGFR, para el tratamiento de pacientes con cáncer con mutaciones primarias o secundarias (como anteriormente) en el dominio quinasa de EGFR.

En una forma de realización, la predicción de las variaciones en el dominio quinasa (catalítico) del EGFR (gen *erbB1*) se realiza *in vitro*. En este método, las células, por ejemplo células fibroblásticas, se transfectaron de forma estable con los ADNc que contienen mutaciones en el dominio quinasa que se han identificado en líneas celulares de cáncer humano. Por ejemplo, las células pueden ser transfectadas con un EGFR que porta una mutación tal como la SEQ ID NO: 495, descrita adicionalmente en la Figura 4A, o con cualquier cantidad de los EGFR mutados del dominio quinasa identificados o aún no identificados. La transfección de los EGFR mutados del dominio quinasa en las células dará lugar a la proliferación aberrante de las células en cultivo. Los métodos de transfección estable son conocidos por aquellos capacitados en la técnica y se definen adicionalmente en Current Protocols in Molecular Biology por F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, K. Struhl y V. B. Chanda (Editores), John Wiley & Sons, 2004. Las células transfectadas reciben a continuación, una dosis aún no letal efectiva de una composición farmacéutica, preferiblemente un inhibidor de la tirosina quinasa, que se predice que inhibe la proliferación celular. En una forma de realización preferida, el fármaco es un anilinoquinazolina, anilinoquinazolina sintética, gefitinib o erlotinib. Las células se pasan en serie en presencia de fármacos y se seleccionan los subclones que sobreviven. Durante muchas generaciones, se seleccionan las células que sobreviven (es decir, que son resistentes al compuesto), y se analizaron las variaciones en el gen *erbB1*. Se pueden predecir luego las variaciones secundarias que se presentan después del tratamiento repetido con un inhibidor de la tirosina quinasa *in vivo*.

Alternativamente, las células se transfectan con ADNc mutante resistente a gefitinib derivado de líneas celulares de NSCLC humano, por ejemplo, NCI-1650 y NCI-1975. Cada línea celular tiene una mutación heterocigota con el dominio quinasa del EGFR, y se espera, por lo tanto, que sea sensible a gefitinib. La mutación del EGFR en NCI-1650 consiste en una supresión en el marco de 15 nucleótidos en la posición 2235 - 2249 (delLE746-A750) en el exón 19, mientras que NCI-1975 tiene una mutación en sentido erróneo en el exón 21 que sustituye una G por T en el nucleótido 2573 (L858R). Como se muestra en este documento, la mutación L858R en NCI-H1975 se activa y confiere mayor sensibilidad al gefitinib *in vitro*. Se pueden utilizar otras líneas celulares de cáncer que albergan mutaciones del dominio quinasa del EGFR. Las líneas celulares de cáncer pueden incluir cáncer de pulmón, así como otros tipos de cáncer que se encuentra que albergan tales mutaciones.

Las células pueden ser tratadas con un mutágeno con el fin de aumentar la frecuencia con la que las células adquieren mutaciones secundarias. Un mutágeno puede inducir mutaciones en diferentes frecuencias dependiendo del régimen de dosificación, modo de administración, y la etapa de desarrollo del organismo o célula después de la administración del mutágeno, donde todos los parámetros se dan a conocer en la técnica anterior para diferentes mutágenos o técnicas de mutagénesis. El mutágeno puede ser un agente alquilante, tal como metanosulfonato de etilo (EMS), N-etil-N-nitrosourea (ENU) o N-metil-N-nitrosourea (MNU). Alternativamente, el mutágeno puede ser, por ejemplo, clorhidrato de focarbaxina (Prc), metanosulfonato de metilo (MeMS), clorambucilo (Chl), melfalán, clorhidrato de porcarbazina, ciclofosfamida (Cp), sulfato de dietilo (Et₂SO₄), monómero de acrilamida (AA), trietilén melamina (TEM), mostaza nitrogenada, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfán, y metanosulfonato de etilo (EtMs). Los métodos de tratamiento de las células con mutágenos se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 6.015.670. Después de la mutagénesis, las células (es decir, transfectadas con EGFR variante

o derivado de una línea celular de cáncer humano) pueden ser cultivadas en un medio suplementado con gefitinib para seleccionar el resultado de los clones resistentes. El subcultivo de los clones individuales puede ser seguido, por ejemplo, por la determinación de la secuencia de nucleótidos del gen *EGFR* después de la amplificación específica mediada por PCR del ADN genómico correspondiente al dominio quinasa del EGFR.

5 En otra forma de realización, las células (con una variación del EGFR) se pasan en forma serial en presencia de concentraciones gradualmente crecientes de gefitinib (o un inhibidor similar de la tirosina quinasa) durante el transcurso de varias semanas o meses con el fin de seleccionar la adquisición espontánea de mutaciones en el gen *EGFR* que confiere resistencia a gefitinib. Las células seleccionadas (que continúan proliferando a una concentración relativamente alta de gefitinib) se pueden aislar en forma de colonias, y se identificarán las mutaciones como se describió anteriormente. Se puede predecir por lo tanto que ocurrirán tales variaciones tras el tratamiento repetido con un inhibidor de tirosina quinasa in vivo. Véase, por ejemplo, Scappini et al., Cancer, abril 1, 2004, vol. 100, página 1459.

15 En aún otra forma de realización, una forma variante del gen EGFR se puede propagar en una cepa bacteriana deficiente para la reparación del ADN antes de volver a introducirlo en líneas celulares seleccionadas de forma estable. La replicación en tales bacterias mejorará la frecuencia de mutagénesis. Alternativamente, se puede utilizar PCR "propenso a errores" para mejorar la frecuencia de mutaciones en el ADN clonado del EGFR in vitro, utilizando métodos estándar, conocidos por aquellos capacitados en la técnica.

20 En otra forma de realización, la predicción de las variaciones en el dominio quinasa del gen *erbB1* se realiza *in vivo*. Por ejemplo, se transfecta una forma variante que incrementa la actividad de la quinasa del gen *erbB1* en un animal, es decir, un ratón, generando un modelo de cáncer. El animal es tratado luego con una dosis efectiva de un compuesto, preferiblemente una anilinoquinazolina, una anilinoquinazolina sintética, gefitinib o erlotinib. Tras la exposición repetida al compuesto, se inhibe inicialmente el cáncer. Al igual que en los seres humanos tratados con tales compuestos, las células tumorales en el animal adquieren mutaciones que las hacen resistentes a tal tratamiento. Los métodos descritos en la presente invención permiten el aislamiento y la caracterización del gen *erbB1* en tales tumores resistentes. Los compuestos que dirigen específicamente estas variaciones recién caracterizadas son útiles en el tratamiento de pacientes de los que se sospecha que portan tal gen *erbB1* mutado. Tales pacientes incluyen, por ejemplo, a los pacientes que inicialmente responden a la terapia con un inhibidor de la tirosina quinasa, pero que posteriormente no responden a la misma o a un compuesto similar.

25 Los métodos de creación de un modelo animal son conocidos por aquellos capacitados en la técnica y se definen con más detalle, por ejemplo, en Ohashi et al., Cell, 65: 305 - 317 (1991); Adams et al., Nature, 325: 223 - 228 (1987); Romano et al., Cell, 61: 383 - 396 (1990). En el caso de oocitos fertilizados, el método preferido para la introducción de transgenes es por microinyección, véase, por ejemplo, Leder et al., patentes de los Estados Unidos Nos. 4.736.866 y 5.175.383, mientras que en el caso de las células madre embrionarias (ES), el método preferido es la electroporación. Sin embargo, se pueden utilizar otros métodos, incluyendo los sistemas de suministro virales tales como infección retroviral, o de fusión liposomal. El aislamiento y la caracterización de ácidos nucleicos se describe anteriormente y en los ejemplos.

30 Las variaciones que incrementan la actividad de la quinasa identificadas anteriormente en el gen *erbB1* pueden ser cribadas en pacientes (en diagnóstico o pronóstico), utilizando los métodos de la presente invención. La presencia o ausencia de tales mutaciones puede ser utilizada entonces como un criterio para determinar la sensibilidad de aquellas al tratamiento con un compuesto dirigido al EGFR, tal como, por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa.

35 Los compuestos que se dirigen específicamente a estas variaciones recién definidas, ya sea detectados in vivo o in vitro, se pueden seleccionar mediante técnicas conocidas en la técnica y se discuten en este documento. Se pueden utilizar ensayos de cribado de fármacos candidatos para identificar agentes candidatos bioactivos que inhiban la actividad de las formas variantes del EGFR. De particular interés son los ensayos de cribado para agentes que tengan una baja toxicidad para las células humanas. Se puede utilizar una amplia variedad de ensayos para este propósito, incluyendo ensayos de enlazamiento proteína - proteína marcados in vitro, ensayos de cambio de movilidad electroforética, ensayos de actividad enzimática, inmunoensayos para enlazamiento de proteína, y similares. La proteína purificada del EGFR mutante también puede usarse para la determinación de la estructura tridimensional del cristal, que puede ser utilizada para el modelado de las interacciones intermoleculares, la función del transportador, etc. Tales compuestos pueden ser, por ejemplo, inhibidores de la tirosina quinasa, anticuerpos, aptámeros, los ARNpi, y vectores que inhiben la actividad de quinasa del EGFR.

40 En otra forma de realización, los compuestos útiles en los métodos descritos aquí son anticuerpos que interfieren con la señalización de la quinasa a través del EGFR mutante, incluyendo los anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados y recombinantes y fragmentos de los mismos que se caracterizan por su capacidad para inhibir la actividad de quinasa del EGFR y que tienen baja toxicidad.

45 Los anticuerpos neutralizantes se elevan rápidamente en animales tales como conejos o ratones mediante la

5 inmunización con un EGFR con al menos una variación de ácido nucleico en su dominio quinasa. Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proporcionar fuentes de células B para la fabricación de hibridomas, que a su vez se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina caracterizadas por dos o más segmentos o porciones derivadas de diferentes especies animales. En general, la región variable del anticuerpo quimérico se deriva de un anticuerpo de mamífero no humano, tal como un anticuerpo monoclonal de murino, y la región constante de la inmunoglobulina se deriva de una molécula de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, ambas regiones y la combinación tienen baja inmunogenicidad, determinada de forma rutinaria. Los anticuerpos humanizados son moléculas de inmunoglobulina creadas por técnicas de ingeniería genética en las que las regiones constantes del murino son reemplazadas con sus contrapartes humanas al tiempo que retienen las regiones de enlazamiento de antígeno de murino. El anticuerpo quimérico de ratón-humano resultante debería haber reducido la inmunogenicidad y mejorado la farmacocinética en humanos. Los ejemplos preferidos de anticuerpos monoclonales de alta afinidad y derivados quiméricos de los mismos, útiles en los métodos de la presente invención, se describen en la solicitud de patente europea EP 186.833; la solicitud de patente PCT WO 92/16553 y la patente de los Estados Unidos No. 6.090.923.

15 Los compuestos existentes o los recientemente identificados como se describió anteriormente son útiles en el tratamiento de pacientes portadores de mutaciones primarias y/o secundarias del EGFR.

20 En una forma de realización preferida, el compuesto es un inhibidor de la actividad de tirosina quinasa de un EGFR con un al menos una variación en su dominio quinasa, particularmente inhibidores de moléculas pequeñas que tienen acción selectiva sobre los EGFR "mutados" en comparación con otras tirosina quinatas. Los inhibidores del EGFR incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de tirosina quinasa tales como quinazolininas, tales como PID 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina o CP - 358.774, piridopirimidinas, pirimidopirimidinas, pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706 y pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas (Traxler et al., (1996) J. Med. Chem. 39: 2285 - 2292), curcumina (diferuloil metano) (Laxminarayana, et al., (1995), Carcinogen 16: 1741 - 1745), 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida (Buchdunger et al. (1995) Clin. Cancer Res. 1: 813 - 821; Dinney et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3: 161 - 168); tirstofinas que contienen fracciones de nitrotiofeno (Brunton et al. (1996) Anti Cancer Drug Design 11: 265 - 295), el inhibidor de proteína quinasa ZD-1 839 (AstraZeneca), CP - 358.774 (Pfizer, Inc.); PD-01 83805 (Warner-Lambert), EKB-569 (Torrance et al., Nature Medicine, Vol. 6, No. 9, septiembre de 2000, página 1024), HKI-272 y HKI-357 (Wyeth); o como se describe en la solicitud internacional de patente WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warener Labert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc.); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/33977 (Zeneca), y WO 96/33980 (Zeneca).

35 En otra forma de realización, se puede utilizar una estrategia antisentido para interferir con la actividad de quinasa de un EGFR variante. Este enfoque puede, por ejemplo, utilizar ácidos nucleicos antisentido o ribozimas que bloquean la traducción de un ARNm específico, ya sea mediante el enmascaramiento de ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o escindiéndolo con una ribozima. Para una discusión general de la tecnología antisentido, véase, por ejemplo, Antisense DNA y RNA, (Cold Spring Harbor Laboratory, D. Melton, ed., 1988).

40 La inhibición corta reversible de la transcripción del gen EGFR de la variante, también puede ser útil. Tal inhibición se puede lograr mediante el uso de los ARNpi. La tecnología de ARN de interferencia (ARNi) evita la expresión de genes mediante el uso de moléculas pequeñas de ARN, tales como los ARN pequeños de interferencia (ARNpi). Esta tecnología a su vez toma ventaja del hecho de que el ARNi es un mecanismo biológico natural para silenciar genes en la mayoría de las células de muchos organismos vivos, de plantas a insectos a mamíferos (McManus et al., Nature Reviews Genetics, 20023, (10) página 737). El ARNi evita que un gen produzca una proteína funcional al garantizar que la molécula intermedia, la copia del ARN mensajero del gen se destruye. Los ARNpi pueden ser utilizados en una forma simple e incorporarse en un vector, tal como se describe a continuación. Se puede hacer uso además de aptámeros para inhibir específicamente la transcripción del gen EGFR de la variante, véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.699.843. Los aptámeros pueden ser identificados usando el proceso SELEX. Los métodos de SELEX han sido descritos, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.707.796, 5.763.177, 6.011.577, 5.580.737, 5.567.588, y 5.660.985.

50 Un "ácido nucleico antisentido" u "oligonucleótido antisentido" es una molécula de ácido nucleico monocatenario, que, por hibridación en condiciones citoplasmáticas con bases complementarias en una molécula de ARN o ADN, inhibe la función de esta última. Si el ARN es un transcrito de ARN mensajero, el ácido nucleico antisentido es un contratranscrito o un ácido nucleico complementario que interfiere con el ARNm. Tal como se utiliza en la actualidad, "antisentido" incluye ampliamente las interacciones ARN-ARN, las interacciones ARN-ADN, ribozimas, ARNi, aptámeros y a captura mediada por ARNasa-H.

55 Los ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otras moléculas de ARN monocatenarias de una manera algo análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. Los ribozimas se descubrieron a partir de la observación de que ciertos ARNm tienen la capacidad para escindir sus propios intrones. Mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos de estos ribozimas, los investigadores han sido capaces de

modificar por ingeniería genética moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicos en una molécula de ARN y escindir las (Cech, 1989, Science 245 (4915) página 276). Debido a que son específicos de la secuencia, sólo los ARNm con secuencias particulares se inactivan.

5 Las moléculas de ácido nucleico antisentido puede ser codificadas por un gen recombinante para la expresión en una célula (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.814.500; 5.811.234), o, alternativamente, se pueden preparar sintéticamente (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.780.607).

10 La presente invención proporciona además métodos de tratamiento de pacientes con cáncer. En particular, los pacientes con al menos una variación de ácido nucleico en el dominio quinasa del EGFR. El método de tratamiento comprende la administración de una composición que contiene ARNpi a un paciente dentro de una ventana de tiempo apropiada. Los ARNpi pueden ser sintetizados químicamente, producidos usando transcripción in vitro, etc. Además, la molécula de ARNpi se puede personalizar para pacientes individuales en una forma tal que corresponda en forma precisa a la mutación identificada en su tumor. Ya que ARNpi puede discriminar entre secuencias de nucleótidos que difieren por sólo un único nucleótido, es posible diseñar ARNpi que dirijan únicamente una forma mutante del gen EGFR que está asociada, ya sea con una única sustitución de nucleótidos o una pequeña supresión de varios nucleótidos, ambos han sido identificados en tumores como se describe en este documento. Los ARNpi han sido descritos en Brummelkamp et al., Science 296; 550 - 553, 2002, Jaque et al., Nature 418; 435 - 438, 2002, Elbashir S. M. et al. (2001) Nature, 411: 494 - 498, McCaffrey et al. (2002), Nature, 418: 38 - 39; Xia H. et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006 - 1010, Novina et al. (2002), Nat. Med. 8: 681 - 686, y la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20030198627.

20 Una ventaja importante de tal estrategia terapéutica en relación con el uso de fármacos tales como gefitinib, que inhiben tanto el receptor mutado como el receptor normal, es que ARNpi dirigido específicamente contra el EGFR mutado no debe inhibir el EGFR de tipo silvestre. Esto es significativo porque en general se cree que los "efectos secundarios" del tratamiento con gefitinib, que incluyen diarrea y dermatitis, son una consecuencia de la inhibición de EGFR en tejidos normales que requieren de su función.

25 El suministro de ARNpi a los tumores potencialmente se puede lograr a través de cualquiera de los diferentes "vehículos" de suministro de genes que están actualmente disponibles. Estos incluyen vectores virales, tales como adenovirus, lentivirus, virus del herpes simple, virus vacuna, y retrovirus, así como sistemas de suministro de genes mediada por productos químicos (por ejemplo, liposomas), o sistemas de suministro mecánico de ADN (pistolas de ADN). Los oligonucleótidos que van a ser expresados por tal inhibición mediada por ARNpi de la expresión génica estarían entre 18 y 28 nucleótidos de longitud.

35 En otra forma de realización, los compuestos son moléculas antisentido específicas para secuencias humanas que codifican para un EGFR que tiene al menos una variación en su dominio quinasa. El agente terapéutico administrado pueden ser oligonucleótidos antisentido, particularmente oligonucleótidos sintéticos, que tienen modificaciones químicas de los ácidos nucleicos nativos, o constructos de ácido nucleico que expresan tales moléculas antisentido como ARN. La secuencia antisentido es complementaria al ARNm de los genes EGFR objetivo, e inhibe la expresión de los productos génicos objetivo (véase, por ejemplo Nyce et al. (1997) Nature 385: 720). Las moléculas antisentido inhiben la expresión génica mediante la reducción de la cantidad de ARNm disponible para la traducción, a través de la activación de ARNasa H o impedimento estérico. Se puede administrar una o una combinación de moléculas antisentido, donde una combinación puede comprender múltiples secuencias diferentes de un solo gen objetivo, o secuencias que complementan varios genes diferentes.

Un gen objetivo preferido es un EGFR con al menos una variación de ácido nucleico en su dominio quinasa. La secuencia del gen se incorpora en este documento, tal como, por ejemplo, en la Figura 5. En general, la secuencia antisentido tendrá la misma especie de origen que el huésped animal.

45 Las moléculas antisentido pueden ser producidas por expresión de la totalidad o de una parte de la secuencia del gen objetivo en un vector apropiado, donde se introduce el vector y se expresa en las células objetivo. La iniciación de la transcripción se orientará de tal manera que la cadena antisentido se produce como una molécula de ARN.

50 El ARN antisentido hibrida con el ARNm de cadena sentido endógena, bloqueando de este modo la expresión del gen objetivo. Se pueden emplear la región de iniciación transcripcional nativa, o una región de iniciación transcripcional exógena. El promotor puede introducirse por métodos recombinantes in vitro, o como el resultado de la integración homóloga de la secuencia en un cromosoma. Se conocen en el arte muchos promotores fuertes que son activos en células musculares, incluyendo el promotor O-actina, promotores tardíos y tempranos de SV40, un promotor de citomegalovirus humano, LTR retrovirales, etc. Los vectores de transcripción generalmente tienen sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia promotora para prever la inserción de secuencias de ácido nucleico. Los casetes de transcripción se pueden preparar para que comprendan una región de iniciación de la transcripción, el gen objetivo o un fragmento del mismo, y una región de terminación transcripcional. Los casetes de transcripción se pueden introducir en una variedad de vectores, por ejemplo un plásmido; un retrovirus, por ejemplo

lentivirus; adenovirus, y similares, donde los vectores son capaces de mantenerse en forma transitoria o estable en las células, por lo general por un período de al menos aproximadamente un día, más usualmente durante un período de al menos aproximadamente varios días.

5 Los aptámeros son también útiles. Los aptámeros son una nueva clase prometedora de oligonucleótidos o péptidos terapéuticos y se seleccionan in vitro para enlazarse específicamente a un objetivo determinado con alta afinidad, tales como por ejemplo receptores del ligando. Sus características de enlazamiento son probablemente un reflejo de la capacidad de los oligonucleótidos para formar estructuras tridimensionales que se mantienen unidas por el apareamiento intramolecular de nucleobases. Los aptámeros son secuencias sintéticas de ADN, ARN o de péptidos que pueden ser normales y modificadas (por ejemplo, ácido péptido nucleico (PNA), ADN tiofosforilado, etc.) que interactúan con una proteína, ligando objetivo (lípidos, carbohidratos, metabolitos, etc.) En una forma de realización adicional, se pueden introducir o expresar en aptámeros de ARN específicos para un EGFR variante en una célula como agente terapéutico.

15 Los ácidos péptido nucleicos (PNA) son compuestos que en algunos aspectos son similares a oligonucleótidos y sus análogos y por lo tanto pueden imitar ADN y ARN. En PNA, la cadena principal de desoxirribosa de oligonucleótidos ha sido reemplazada por una cadena principal pseudopeptídica (Nielsen et al. 1991 Science 254, 1457 - 1500). Cada subunidad, o monómero, tiene una nucleobase de origen natural o de origen no natural unida a esta cadena principal. Una de tales cadenas principales está construida de unidades de repetición de N-(2-aminoetil)glicina enlazada a través de enlaces de amida. PNA se hibrida con ácidos nucleicos complementarios a través del apareamiento de bases de Watson y Crick y la formación de la hélice. La cadena principal de pseudopéptido proporciona propiedades de hibridación superiores (Egholm et al. Nature (1993) 365, 566 - 568), resistencia a la degradación enzimática (Demidov et al. Biochem. Pharmacol. (1994) 48, 1310 - 1313) y acceso a una variedad de modificaciones químicas (Nielsen y Haaija Chemical Society Reviews (1997) 73 - 78). Los PNA específicos para un EGFR variante pueden ser introducidos o expresados en una célula como agente terapéutico. Los PNA han sido descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20040063906.

25 Los pacientes a ser tratados con un compuesto que se dirige a una variante del EGFR incluyen, por ejemplo, los pacientes diagnosticados con una mutación primaria o secundaria en su EGFR, los pacientes que inicialmente responden a la terapia con inhibidor de tirosina quinasa, pero que posteriormente no responden al mismo compuesto o a uno similar. Alternativamente, los compuestos que se dirigen a las mutaciones de EGFR secundarios pueden ser administrados a pacientes con cáncer en combinación con compuestos que se dirigen a las mutaciones primarias del EGFR, por ejemplo, gefitinib, como una terapia de combinación. Mediante la combinación de compuestos que se dirigen tanto a mutaciones primarias como secundarias del EGFR, se reducirá la probabilidad de resistencia.

35 Mutaciones adicionales de EGFR que confieren resistencia a terapéuticos contra el cáncer actualmente conocidos, incluyendo pero sin limitarse a inhibidores de tirosina quinasa del EGFR gefitinib, erlotinib y similares, están dentro del alcance de la invención. Se predice que mutantes resistentes del EGFR tienen mutantes análogos a los mutantes identificados en los dominios quinasa de proteínas que contienen un dominio relacionado de tirosina quinasa que tienen alta homología en esta región quinasa. Los artículos que describen mutaciones en proteínas análogas incluyen aquellos conocidos en la técnica para BCR-ABL. Véase, por ejemplo, Bradford et al. Blood. 2003 1 de julio; 102 (1): 276 - 83, Epub 2003, 06 de marzo; Hachhaus et al., Leukemia. 2002 Nov. 16 (11): 2190 - 6; y Al-Ali et al., J. Hematol 2004; 5 (1): 55 - 60.

40 Un EGFR mutante resistente a los inhibidores conocidos de la tirosina quinasa del EGFR incluye uno o más polipéptidos del EGFR, o un nucleótido que los codifica, con un residuo de tipo no silvestre en una o más posiciones análogas a los residuos c-abl (BCR- ABL) que confirman un fenotipo resistente al imatinib. Los residuos que cuando mutan en EGFR confieren resistencia a los fármacos incluyen especialmente aquellos residuos del dominio quinasa, incluyendo pero sin limitarse, por ejemplo, al bucle P y el bucle de activación, en donde los residuos mutados en el polipéptido del EGFR son análogos a los residuos c-able. Los mutantes contemplados resistentes del EGFR tienen residuos de tipo no silvestre en las posiciones de aminoácidos que son análogos a al menos las posiciones Met 244, Leu 248, Gly 250, Gln 252, Tyr 253, Glu 255, Asp 276, Thr 315, Phe 317, Met 351, Glu 355, Phe 359, Su 396, Ser 417, y Phe 486 de BCR-ABL, véase, por ejemplo, la Tabla S3C y la FIG. 9. Estos residuos BCL-ABL corresponden a los residuos de Lys 714, Leu 718, Ser 720, Ala 722, Phe 723, Thr 725, Ala 750, Thr 790, Leu 792, Met 825, Glu 829, Leu 833, His 870, Thr 892, Phe 961, respectivamente, en EGFR. Véase, por ejemplo, la Tabla S3C, FIG. 9.

Pruebas de pronóstico

55 Los métodos de la presente invención se utilizan como un indicador de pronóstico del desarrollo de cáncer. Alternativamente, los métodos se utilizan para detectar el cáncer que está presente, pero aún no ha sido diagnosticado o está en una etapa que es indetectable. Los pacientes en situación de riesgo de desarrollar cáncer son seleccionados, utilizando los métodos de la presente invención, por la presencia de actividad de la quinasa que incrementa la variación de ácido nucleico en el gen erbB1. La presencia de una variación o variaciones en el dominio quinasa del gen erbB1 indica la presencia o la presencia inminente de cáncer. Por lo tanto, la presencia de

variaciones en el dominio quinasa del gen *erbB1* sugiere que un paciente se beneficiaría de un tratamiento dirigido al EGFR. Como se describe en este documento, un tratamiento dirigido al EGFR es preferentemente un tratamiento con un inhibidor de la tirosina quinasa.

- 5 En una forma de realización preferida de la presente invención, se selecciona un paciente por la presencia o ausencia de variaciones de ácido nucleico en el dominio quinasa del gen *erbB1* mediante la obtención de una muestra biológica. La muestra puede ser cualquier muestra del paciente, incluyendo el tejido, por ejemplo, de la lengua, boca, mejilla, tráquea, tubo bronquial, pulmones, etc. o fluido, por ejemplo, a partir de esputo o aspirado de pulmón. Los métodos de obtención de estos especímenes biológicos son bien conocidos por aquellos capacitados en la técnica.
- 10 Por lo tanto, la invención proporciona un método para identificar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad de EGFR mutante aberrante en la cual se obtiene una muestra de ensayo de un individuo y se detecta la proteína del EGFR mutante o el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico), en donde la presencia de la proteína EGFR mutante o el ácido nucleico es diagnóstica para un individuo que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad de EGFR mutante aberrante.
- 15 Como se usa en este documento, una "muestra de ensayo" se refiere a una muestra biológica obtenida de un individuo de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (por ejemplo, suero), muestra celular, o tejido, especialmente una muestra de biopsia de tejido.

- 20 Por otra parte, los ensayos de pronóstico descritos en este documento pueden ser utilizados para determinar si se le puede administrar a un individuo un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro fármaco candidato) para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad del EGFR mutante aberrante. Por ejemplo, se pueden utilizar tales métodos para determinar si un individuo puede ser tratado efectivamente con un agente para un trastorno. Por lo tanto, la invención proporciona métodos para determinar si un individuo puede ser tratado efectivamente con un agente para un trastorno asociado con la expresión o actividad del EGFR mutante aberrante en donde se obtiene una muestra de
- 25 ensayo y se detecta la proteína o el ácido nucleico del EGFR mutante (por ejemplo, en donde la presencia de la proteína o el ácido nucleico del EGFR mutante es diagnóstica para un individuo al que se le puede administrar el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad del EGFR mutante).

Ejemplos

Ejemplo 1

- 30 Análisis de la secuencia de nucleótidos de especímenes tumorales

- Los especímenes tumorales de procedimientos quirúrgicos o de diagnóstico inicial se obtuvieron de pacientes con NSCLC que fueron posteriormente tratados con Gefitinib, en virtud de un protocolo aprobado por el IRB. Especímenes tumorales congelados, junto con el tejido normal correspondiente, estaban disponibles para cuatro
- 35 casos, y se utilizó material embebido en parafina para los especímenes restantes. Además, se obtuvieron 25 casos no seleccionados de NSCLC primario (15 broncoalveolares, 7 de adenocarcinoma, y 3 de cánceres de pulmón de células grandes), con los tejidos normales correspondientes, del banco de tumores del Hospital General de Massachusetts. Para el análisis mutacional de toda la secuencia de codificación del EGFR, se extrajo ADN de los especímenes, seguido por la amplificación de todos los 28 exones, secuenciación automatizada de los fragmentos de PCR no clonados, y el análisis de electroferogramas, tanto en dirección sentido como antisentido para la
- 40 presencia de mutaciones heterocigotas. Se confirmaron todas las variantes de la secuencia por medio de amplificaciones independientes múltiples de la PCR. Las secuencias del cebador y las condiciones de amplificación se suministran en la sección Material complementario. Se buscaron también mutaciones del EGFR en los exones 19 y 21 en tumores primarios de mama (15 casos), de colon (20 casos), de riñón (16 casos), y de cerebro (4 casos), junto con un panel de 78 líneas celulares de cáncer que representan diversas histologías (enumeradas a
- 45 continuación).

Análisis funcional de constructos del EGFR mutante

- Se introdujeron las mutaciones L858R y delL747-P753insS en la secuencia de codificación de longitud completa de *EGFR* usando mutagénesis dirigida al sitio y se insertaron en un constructo de expresión conducido por citomegalovirus (pUSE, Upstate). Se transfectaron células Cos-7 (Lipofectamine 2000, Invitrogen), utilizando 1 µg de los constructos de expresión, seguido después de 18 horas por una resiembra a razón de 5×10^4 células / pozo (placas de 12 pozos, Costar) en DMEM que carecen de suero de ternera fetal. Después de 16 horas de privación de suero, se estimularon las células con 10 ng / ml de EGF (SIGMA). Para demostrar la inhibición de Gefitinib, se
- 50 añadió el fármaco al medio de cultivo 3 horas antes de la adición del EGF (30 min de estimulación con 100 ng / ml del EGF). Se prepararon los lisados celulares en 100 µL de amortiguador de lisis de Laemmli, seguido por la resolución de proteínas en SDS-PAGE al 10%, transferencia a membranas de PVDF, y análisis de transferencia tipo
- 55

Western usando reactivo de quimioluminiscencia mejorado (Amersham). Se midió la autofosforilación del EGFR utilizando anticuerpo para fosfotirosina Y-1068, y se mostró la expresión comparable de proteína utilizando anticuerpo anti-EGFR (concentración de trabajo de 1:100; Cell Signaling Technology).

Análisis mutacional

5 Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los 28 exones que contenían el gen EGFR utilizando ADN aislado de tejido tumoral primario o líneas de células derivadas de tumores. Los pares de cebadores utilizados fueron: Exón 1, CAGATTTGGCTCGACCTGGACATAG (sentido) (SEQ ID NO: 513) y CAGCTGATCTCAAGGAAACAGG (antisentido) (SEQ ID NO: 514); Exón 2, GTATTATCAGTCAC TAAAGCTCAC (sentido) (SEQ ID NO: 515) y CACACTTCAAGTGAATTCTGC (SEQ ID NO: 516); Exón 3, CTCGTG TGCATTAGGGTTCAACTGG (sentido) (SEQ ID NO: 517) y CCTTCTCCGAGGTGGAATTGAGTGAC (antisentido) (SEQ ID NO: 518); Exón 4, GCTAATTGCGGGACTCTTGTTCCGAC (sentido) (SEQ ID NO: 519) y TACATGC TTTTCTAGTGGTCTAG (antisentido) (SEQ ID NO: 520); Exón 5, GGTCTCAAGTGATTCTACAAACCAG (sentido) (SEQ ID NO: 521) y CCTTCACCTACTGGTTCACATCTG (antisentido) (SEQ ID NO: 522); Exón 6, CATGGT TTGACTTAGTTTGAATGTGG (sentido) (SEQ ID NO: 523) y GGATACTAAAGATACTTTGTCCAC CAGG (antisentido) (SEQ ID NO: 524); Exón 7, GAACACTAGGCTGCAAAGACAGTAAC (sentido) (SEQ ID NO: 525) y CCAAGCAAGGCAAACACATCCACC (antisentido) (SEQ ID NO: 526); Exón 8, GGAGGATGGAGCC TTTCCATCAC (sentido) (SEQ ID NO: 527) y GAAGAGGAAGATGTGTTCTTTGG (antisentido) (SEQ ID NO: 528); Exones 9 y 10, GAATGAAGGATGATGTGGCAGTGG (sentido) (SEQ ID NO: 529) y CAAAACATCAGCC ATTAACGG (antisentido) (SEQ ID NO: 530); Exón 11, CCACTTACTGTTCATATAATACAGAG (sentido) (SEQ ID NO: 531) y CATGTGAGATAGCATTGGGAATGC (antisentido) (SEQ ID NO: 532); Exón 12, CATGACCT ACCATCATTGGAAAGCAG (sentido) (SEQ ID NO: 533) y GTAATTCACAGTTAGGAATC (sentido) (SEQ ID NO: 534); Exón 13, GTCACCCAAGGTCATGGAGCACAGG (sentido) (ID SEC NO: 535) y CAGAATGC CTGTAAAGCTATAAC (antisentido) (SEQ ID NO: 536); Exón 14, GTCCTGGAGTCCCAACTCCTTGAC (sentido) (SEQ ID NO: 537) y GGAAGTGGCTCTGA TGGCCGTCCTG (antisentido) (SEQ ID NO: 538); Exón: 15, CCAC TCACACACACTAAATATTTTAAAG (sentido) (SEQ ID NO: 539) y GACCAAAACACCTTAAGTAA CTGACTC (antisentido) (SEQ ID NO: 540); Exón 16, CCAA TCCAACATCCAGACACATAG (sentido) (SEQ ID NO: 541) y CCAGGCCATAGAACTTGATCAG (antisentido) (SEQ ID NO: 542); Exón 17, GTATGGACTATGGC ACTTCAATTGCATGG (sentido) (SEQ ID NO: 543) y CCAGAGAACATGGCAACCAGCACAGGAC (antisentido) (SEQ ID NO: 544); Exón 18, CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC (sentido) (SEQ ID NO: 545) y GAGTTT CCCAAACACTCAGTGAAAC (antisentido) (SEQ ID NO: 546) o CAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (sentido) (SEQ ID NO: 675) y CCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (antisentido) (SEQ ID NO: 676); Exón 19, GCAATATCAGCC TTAGG TGC GGCTC (sentido) (SEQ ID NO: 547) y CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG (antisentido) (SEQ ID NO: 548); Exón 20, CCATGAGTACGTATTTTGAAGCTC (sentido) (SEQ ID NO: 549) y CATATCC CCATGGC AAACCTTTGC (antisentido) (SEQ ID NO: 550); Exón 21, CTAACGTTTCGCCATAAGTCC (sentido) (SEQ ID NO: 551) y GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG (antisentido) (SEQ ID NO: 552); Exón 22, GACGGG TCCTGGGGTGATCTGGCTC (sentido) (SEQ ID NO: 553) y CTCAGTACAATAGATAGACAGCAATG (antisentido) (SEQ ID NO: 684); Exón 23, CAGGACTACAGAAATGTAGGTTTC (sentido) (SEQ ID NO: 555) y GTGCCTG CCTTAAGTAATGTGATGAC (antisentido) (SEQ ID NO: 556); Exón 24, GACTGG AAGTGTGCGA TCACCAATG (sentido) (SEQ ID NO: 557) y GGTTTAATAATGCGATCTGGGACAC (antisentido) (SEQ ID NO: 558); Exón 25, GCAGCTATAATTTAGAGAACCAAGG (sentido) (ID SEC N °: 559) y GGTT AAAATTGACTTC ATTTCCATG (antisentido) (SEQ ID NO: 560); Exón 26, CCTAGTTGCTCTAAA ACTAAGC (sentido) (SEQ ID NO: 561) y CTGTGAGGCGTGACAGCCGTGAC (antisentido) (SEQ ID NO: 562); Exón 27, CAACCTACTAATCAG AACCAGCATC (sentido) (SEQ ID NO: 563) y CCTTCACTGTGTCTGC AAATCTGC (antisentido) (SEQ ID NO: 564); Exón 28, CCTGTCATAAGTCTCCTTGTGAG (sentido) (SEQ ID NO: 565) y CAGTCTGTGGGTCTAAG AGCTAATG (antisentido) (SEQ ID NO : 566). Las temperaturas de hibridación fueron 58 °C (exones 1, 3, 4, 7 - 10, 12 - 25, 27, y 28), 56 °C (exones 2, 5, 6, y 26), o 52 °C (exón 11).

La amplificación por PCR anidada del ADN extraído de tejido tumoral de archivo se llevo a cabo de la siguiente manera. Se generó un PCR inicial para los exones 2, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, y 27, utilizando los cebadores y condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, se amplificaron 2 µl de esta reacción en una PCR secundaria utilizando los siguientes pares de cebadores internos: Exón 2, CAGGAATGGGTGAGTCTCTGTGTG (sentido) (SEQ ID NO: 567) y GTGGAATTCTGCCAGGCCTTTC (antisentido) (SEQ ID NO: 568); Exón 5, GATTCTACAAACCA GCCAGCCAAAC (sentido) (SEQ ID NO: 569) y CCTACTGGTTCACATCTGACCCTG (antisentido) (SEQ ID NO: 570); Exón 6, GTTTGAATGTGGTTTCGTTGGAAG (sentido) (SEQ ID NO: 571) y CTTTGTACCAGG CAGAGG GCAATATC (antisentido) (SEQ ID NO: 572); Exón 7, GACAGTAACTGGGCTTTCTGAC (sentido) (SEQ ID NO: 573) y CATCCACCCAAAGACTCTCCAAG (antisentido) (SEQ ID NO: 574); Exón 11, CTGTTTATA TAATAC AGAGTCCCTG (sentido) (SEQ ID NO: 575) y GAGAGATGCAGGAGCTCTGTGC (antisentido) (SEQ ID NO: 576); Exón 12, GCAGTTTGTAGTCAATCAAAGGTGG (sentido) (SEQ ID NO: 577) y GTAATTTAAATGGGAAT AGCCC (antisentido) (SEQ ID NO: 578); Exón 14, CAACTCCTTGACCATTACCTCAAG (sentido) (SEQ ID NO: 579) y GATGGCCGTCTGCCACACAGG (antisentido) (SEQ ID NO: 580); Exón 16, GAGTAGTTTAGCA TATATTGC (sentido) (SEQ ID NO: 581) y GACAGTCAGAAATGCAGGAAAGC (antisentido) (SEQ ID NO: 582); Exón 18,

5 CAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (sentido) (SEQ ID NO: 583) y CCAAACACTCA GTGAAACAAAGAG (antisentido) (SEQ ID NO: 584) o GCACCCAAGCCCATGCCGTGGCTGC (sentido) (SEQ ID NO: 677) y GAAACAAAGAGTAAAGTAGATGATGG (antisentido) (SEQ ID NO: 678); Exón 19, CCTTAGGTGCGGCTCCACAGC (sentido) (SEQ ID NO: 585) y CATTTAGGATGTGGAGATGAGC (antisentido) (SEQ ID NO: 586); Exón 20, GAAACTCAAG ATCGCATTTCATGC (sentido) (SEQ ID NO: 587) y GCAAACCTTTGCTATCCCAGGAG (antisentido) (SEQ ID NO: 588); Exón 21, CAGCCATAAGTCCTCGACGTGG (sentido) (SEQ ID NO: 589) y CATCCTCCCCT GCATGTGTAAAC (antisentido) (SEQ ID NO: 590); Exón 23, GTAGTTTCTAAACATCAAGAAAC (sentido) (SEQ ID NO: 591) y GTGATGACATTTCTCCAGGGATGC (antisentido) (SEQ ID NO: 592); Exón 24, CATCACCA ATGCCTTCTTTAAGC (sentido) (SEQ ID NO: 593) y GCTGGAGGGTTTAATAATGCGATC (antisentido) (SEQ ID NO: 594); Exón 25, GCAAACACACAGGCACCTGCTGGC (sentido) (SEQ ID NO: 595) y CATTTC CATGTGAGTTTCACTAGATGG (antisentido) (SEQ ID NO: 596); Exón 26, CACCTTCACAATATACCCTCCATG (sentido) (SEQ ID NO: 679) y GACAGCCGTGCAGGGAAAAACC (antisentido) (SEQ ID NO: 680); Exón 27, GAACCAGCATCTCAAGGAGATCTC (sentido) (SEQ ID NO: 681) y GAGCACCTGGCTTGGACACTGGAG (antisentido) (SEQ ID NO: 682).

15 La amplificación por PCR anidada para el resto de los exones consistió de PCR primaria utilizando los siguientes cebadores. Exón 1, GACCGGACGACAGGCCACCTCGTC (sentido) (SEQ ID NO: 597) y GAAGAACGAAACGTCCCCTTCTCC (antisentido) (SEQ ID NO: 598); Exón 3, GTTGAGCACT CGTGTGCATTAGG (sentido) (SEQ ID NO: 599) y CTCAGTGACGTGACTGGGTA (antisentido) (SEQ ID NO: 600); Exón 4, GTTCACTGGGCTAATTGCGGGACTCTTGTTCGCAC (sentido) (SEQ ID NO: 601) y GGTA AATACATGCTTTTCTAGTGGTCAG (antisentido) (SEQ ID NO: 602); Exón 8, GGAGGATGGA GCCTTTCCATCAC (sentido) (SEQ ID NO: 603) y GAAGAGGAAGATGTGTTCTTGG (antisentido) (SEQ ID NO: 604); Exón 9, GAATGAAGGATGATGTGGCAGTGG (sentido) (SEQ ID NO: 605) y GTATGTGTGAAGGAG TCACTGAAAC (antisentido) (SEQ ID NO: 606); Exón 10, GGTGAGTCACAGGTTCAAGTTC (sentido) (SEQ ID NO: 607) y CAAAACATCAGCCATTAACGG (antisentido) (SEQ ID NO: 608); Exón 13, GTAGCCAGCATGTC TGTGTCAC (sentido) (SEQ ID NO: 609) y CAGAATGCCTGTAAAGCTATAAC (antisentido) (SEQ ID NO: 610); Exón 15, CATTGGCTTTCCCACTCACAC (sentido) (SEQ ID NO: 611) y GACCAAAACACCTTAA GTAAGTACTC (antisentido) (SEQ ID NO: 612); Exón 17, GAAGCTACATAGTGTCTCACTTTCC (sentido) (SEQ ID NO: 613) y CACAAGTCTAATGGCCGTTCTCG (antisentido) (SEQ ID NO: 614); Exón 22, GAGCAGCCCTGAACTCCGTCAGACTG (sentido) (SEQ ID NO: 683) y CTCAGTACAATAGATAGACAGCAATG (antisentido) (SEQ ID NO: 684); Exón 28a, GCTCC TGCTCCCTGTCATAAGTC (sentido) (SEQ ID NO: 615) y GAAGTCTGCTGGTAGTCAGGGTTG (antisentido) (SEQ ID NO: 616); Exón 28b, CTGCAGTGGCAACCCCGAGTATC (sentido) (SEQ ID NO: 617) y CAGTC TGTGGGTCTAAGAGCTAATG (antisentido) (SEQ ID NO: 618). La amplificación secundaria por PCR se realizó utilizando pares de cebadores: Exón 1, GACAGGCCACCTCGTCGCGCTC (sentido) (SEQ ID NO: 619) y CAGCTGATCTCAAGGAAACAGG (antisentido) (SEQ ID NO: 620); Exón 3, CTCGTG TGCATTA GGGTTCAACTGG (sentido) (SEQ ID NO: 621) y CCTTCTCCGAGGTGGAATTGAGTGAC (antisentido) (SEQ ID NO: 622); Exón 4, GCTAATTGCGGGACTCTTGTTCGCAC (sentido) (SEQ ID NO: 623) y TACATGCTTT TCTAGTGGTCAG (antisentido) (SEQ ID NO: 624); Exón 8, CCTTTCCATCACCCCTCAAGAGG (sentido) (SEQ ID NO: 625) y 'GATGTTCCTTTGGAGGTGGCATG (antisentido) (SEQ ID NO: 626); Exón 9, GATGTGG CAGTGGCGGTTCCGGTG (sentido) (SEQ ID NO: 627) y GGAGTCACTGAAACAAACAACAGG (antisentido) (SEQ ID NO: 628); Exón 10, GGTTCAAGTGTGTTGATAAAG (sentido) (SEQ ID NO: 629) y CCATTAACGGT AAAATTTTCAAG (antisentido) (SEQ ID NO: 630); Exón 13, CCAAGGTCATGGAGCACAGG (sentido) (SEQ ID NO: 631) y CTGTAAAGCTATAACAACAACCTGG (antisentido) (SEQ ID NO: 632); Exón 15, CCACTCACA CACTAAATATTTAAG (sentido) (SEQ ID NO: 633) y GTAAGTACTCAAATACAAACCAC (antisentido) (SEQ ID NO: 634); Exón 17, GAAGCTACATAGTGTCTCACTTTCC (sentido) (SEQ ID NO: 635) y CACAA CTGCTAATGGCCGTTCTCG (antisentido) (SEQ ID NO: 636); Exón 22, GACGGGTCTGGGGTGTCTGGCTC (sentido) (SEQ ID NO: 685) y CTCAGTACAATAGATAGACAGCAATG (antisentido) (SEQ ID NO: 686); Exón 28a, CCTGTCATAAG TCTCCTTGTGAG (sentido) (SEQ ID NO: 637) y GGTAGTCAGGGTTGTCCAGG (antisentido) (SEQ ID NO: 638); Exón 28b, CGAGTATCTCAACTGTCCAGC (sentido) (SEQ ID NO: 639) y CTAAGAGCTAATGCGGGC ATGGCTG (antisentido) (SEQ ID NO: 640). La temperatura de hibridación para las amplificaciones del exón 1 fue de 54° C. Las temperaturas de hibridación tanto para las amplificaciones primaria como secundaria fueron de 58 °C (exones 3, 4, 7 - 10, 12 - 17, 19 - 25, 27, y 28), 56 °C (exones 2, 5, 6, y 26), o 52 °C (exones 11 y 18).

55 Los amplicones de la PCR se purificaron usando exonucleasa I (United States Biochemical, Cleveland, OH), y fosfatasa alcalina de camarón (United States Biochemical, Cleveland, OH) antes de la secuenciación. El ADN purificado se diluyó y se realizó el ciclo de secuenciación utilizando el kit v1.1 BigDye Terminator de ABI (ABI, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis en un analizador genético ABI 3100. Se analizaron los electroferogramas tanto en dirección sentido como antisentido por la presencia de mutaciones, utilizando el software Sequence Navigator en combinación con Factura para marcar las posiciones de los heterocigotos. Todas las variantes de la secuencia se confirmaron en múltiples amplificaciones independientes de PCR y reacciones de secuenciación.

Líneas celulares derivadas de cáncer:

Se analizó un panel de 14 líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón se analizó por mutaciones del EGFR. Estos se derivaron de tumores de NSCLC (N = 5), cáncer de pulmón de células pequeñas (N = 6), carcinoma adenoescamoso (N = 1), carcinoma bronquial (N = 1), y de histología desconocida (N = 1). Las líneas celulares específicas fueron: NCI-H460, NCI-522, HOP-92, NCIH841, NCIH734, NCIH2228, NCIH596, NCIH727, NCIH446, NCIH1781, NCIH209, NCIH510, NCIH82, NCIH865. Además, se seleccionaron 64 líneas celulares derivadas de cáncer para las mutaciones en los exones 19 y 21. Estas representaron las siguientes histologías: cáncer de mama (BT549, BT483, UACC893, HS467T, HS578T, MCF7, MCF7-ADR, MDA-MB-15, MDA-MB-175, MDA-MB-231, MDA-MB-415, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468, T47D), cáncer de ovario (ES-2, IGROV-1, MDAH2774, OV1063, OVCAR3, OVCAR4, OVCAR5, SKOV3, SW626), cánceres del SNC (SF-295, SNB-19, U-251, CCF-STTG1, SW-1088, SW-1783, T98G, M059K, A172, SK-N-DZ, SK-N-MC), leucemia (CCRF-CEM, K562, MOLT-4, RPMI8226, SR), cáncer de próstata (DU-145, PC-3), cáncer de colon (COLO-205, HCT-116, HCT-15, HT-29, SW-620), cáncer renal (786-O, ACHN, CAKI-1, SN-12C, UO-31), melanoma (LOX-IMVI, M14, SKMEL2, UACC-62), osteosarcoma (SAOS-2), y cánceres de cabeza y cuello (O11, O13, O19, O28, O22, O29, O12). Las líneas de células de cáncer de cabeza y cuello fueron proporcionadas por el Dr. James Rocco, Massachusetts General Hospital / Massachusetts Eye and Ear Infirmary. El resto de las líneas celulares están disponibles a través de la American Type Culture Collection (Manassas, VA).

El ADN genómico se aisló a partir de especímenes tumorales congelados en forma instantánea. Se molieron primero especímenes de tumor hasta un polvo fino usando un mortero y mano de mortero previamente enfriados y esterilizados. Se transfirió inmediatamente el tejido tumoral a una solución de extracción de ADN que consiste de cloruro de sodio 100 mM, Tris 10 mM pH 7,5, EDTA (ácido etilendiamina tetra acético disódico) 25 mM pH 8,0, y dodecil sulfato de sodio al 0,5% (p / v), y 100 µg / ml de proteinasa K recientemente preparada y se incubó durante la noche a 37° C o durante 3 horas a 50° C. Se extrajo luego el ADN, utilizando los métodos estándar de fenol-cloroformo, se precipitó con etanol, se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en amortiguador TE. Se determinó la concentración de ADN espectrofotométricamente. Se amplificaron los Exones 19 y 21 del EGFR humano mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los siguientes pares de cebadores: cebador sentido del Exon19, 5'-GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO: 505); cebador antisentido del Exón 19, 5'-CATAGAA AGTGAACATTTAGGATGTG-3' (SEQ ID NO: 506); cebador sentido del Exón 21, 5'-CTAACGTTCCG CCAGCCATAAGTCC-3' (SEQ ID NO: 507); cebador antisentido del Exón 21, 5'-GCTGCGAGCTCACCCAG AATGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 508). Para cada muestra, se amplificaron 20 ng de ADN genómico en una reacción PCR que consiste de 1X amortiguador Expand Long Template 1 (Roche, Mannheim Alemania), dATP grado secuenciación 50 M (Amersham Biosciences, Cleveland, OH), dCTP grado secuenciación 50 µM (Amersham Biosciences, Cleveland OH), dGTP grado secuenciación 50 µM (Amersham Biosciences, Cleveland OH), dTTP grado secuenciación 50 µM (Amersham Biosciences, Cleveland OH), cebador sentido 0,2 µM, cebador antisentido 0,2 µM, 1,25 unidades de mezcla de la enzima Expand Long Template (Taq ADN polimerasa / Tgo ADN polimerasa) (Roche, Mannheim, Alemania) que ha sido previamente incubada durante 5 minutos en hielo con 1/6 de volumen de Anticuerpo TaqStart (1,1 µg/µl) (Clontech, Palo Alto, CA) y agua hasta un volumen final de 25 µl. Cada serie de amplificaciones también incluye un control negativo para el que se omite el molde de ADN. Las condiciones de los ciclos de la PCR para ambos exones fueron 95° C durante 2 min seguido de 40 ciclos de 95° C durante 30 s, 58° C durante 30 s y 72° C durante 45 s, y una extensión final de 72° C durante 10 min seguido de mantenimiento a 4° C en un Termociclador PTC-200 o PTC-225 de MJ-Research (MJ-Research, Waltham, MA).

Los productos de la PCR se resolvieron por electroforesis a través de un gel de agarosa al 0,8% para asegurar la amplificación del material del paciente y que no hubiera amplificación en el control negativo. Se purificaron los productos de la PCR antes de la secuenciación mediante la mezcla de 10 µl de cada amplicón de la PCR con 0,5 µl de exonucleasa I (10 U / µl) (United States Biochemical, Cleveland, OH), y 1 µl de fosfatasa alcalina de camarón (1 U / µl) (United States Biochemical, Cleveland, OH) e incubando a 37° C durante 20 minutos, seguido de inactivación a 80° C durante 15 minutos en un termociclador (MJ-Research, Waltham, MA). Se diluyó ADN purificado en agua, de acuerdo con la intensidad del amplicón, y se llevó a cabo el ciclo de secuenciación utilizando el kit v1.1 BigDye Terminator de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ciclo de secuenciación se realizó en un termociclador de MJ-Research usando las siguientes condiciones para el ciclo: los cebadores utilizados para la secuenciación fueron: cebador sentido del Exón 19, 5'-GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO: 505); cebador antisentido del Exón 19, 5'-CATAG AAAGTGAACATTTAGGATGTG-3' (SEQ ID NO: 506); cebador sentido del Exón 21, 5'-CTAACGTTCCGCCAG CCATAAGTCC-3' (SEQ ID NO: 507) o 5'-CGTGGAGAGGCTCAGAGCCTGGCATG-3' (SEQ ID NO: 687); cebador antisentido del Exón 21, 5'-GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 508). Las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis en un analizador genético ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se utilizaron los programas de software Factura y Sequence Navigator (Applied Biosystems, Foster City, CA) para marcar las posiciones posibles de los heterocigotos y los muestra para su evaluación. Las posiciones de los nucleótidos en las cuales la altura del pico secundario fue mayor que, o igual a, 30% de la altura del pico principal se marcaron como heterocigotos y se confirmaron mediante análisis tanto de lecturas sentido como antisentido. Las muestras con una secuencia indicativa de la presencia de una mutación fueron amplificadas nuevamente y secuenciadas para la confirmación.

Posición de los cebadores utilizados en el análisis de secuencia con relación a los Exones 19 y 21

Los cebadores intrónicos se muestran en minúsculas y subrayados.

La secuencia intrónica se muestra en minúsculas.

La secuencia exónica se muestra en mayúsculas.

Exón 19 del EGFR (5' - 3') (SEQ ID NO: 641)

gcaatatcagccttaggtgcggtccacagcccagtgtcctcaccttcggggtgcatcgc
tggtaacatccaccagatcactgggcagcatgtggcaccatctcacaattgccagttaacg
tcttccttctctctctgtcatagGGACTCTGGATCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATTCCC
GTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTCGATgt
gagtttctgctttgctgtgtgggggtccatggctctgaacctcaggcccaccttttctcatg
tctggcagctgctctgctctagaccctgctcatctccacatcctaaatgttcactttctatg

5

Exón 21 del EGFR (5' - 3') (SEQ ID NO: 642) o (SEQ ID NO: 687)

ctaacgttcgccagccataagtcctcgacgtggagaggctcagagcctggcatgaacatgac
cctgaattcggatgcagagcttcttcccatgatgatctgtccctcacagcagggtcttctct
gtttcagGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTGGCAGCCAGGA
ACGTACTGGTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCTG
GGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAgtaaggaggtggctttaggtcag
ccagcattttctgacaccagggaccaggctgccttcccactagctgtattgtttaacacat
gcaggggaggatgctctccagacattctgggtgagctcgcagc

10 Resultados

Características clínicas de las respuestas al gefitinib

Los pacientes con NSCLC avanzado reacio a la quimioterapia han sido tratados con gefitinib como único agente desde el año 2000 en el Hospital General de Massachusetts. Un total de 275 pacientes fueron tratados, tanto antes de su aprobación en mayo de 2003 por la FDA, como parte de un programa de acceso más amplio de uso compasivo, y después de esa fecha a través del uso del producto obtenido en el comercio. Durante este período, se identificó por parte de los médicos que 25 pacientes tenían respuestas clínicas significativas. Una respuesta clínica significativa se define ya sea como una respuesta parcial según criterios RECIST para los pacientes con enfermedad medible, o para los pacientes cuya carga tumoral no podía ser cuantificada usando estos criterios, dos médicos evaluaron una respuesta que pudiera ser medida. La Tabla 1 muestra las características clínicas de 9 casos para los cuales las muestras de tumor obtenidas en el momento del diagnóstico inicial estaban disponibles. Para los otros que responden al gefitinib, el tejido no estaba disponible, más comúnmente, porque las muestras de diagnóstico se limitaron a una citología de los aspirados con aguja. Como grupo, los 9 pacientes experimentaron beneficio sustancial con el gefitinib. La supervivencia media desde el inicio del tratamiento con el fármaco es de más de 18 meses, y la duración media de la terapia es mayor a 16 meses. De acuerdo con informes previos, aquellos que responden al gefitinib tienen una alta prevalencia de sexo femenino, ausencia de antecedentes de tabaquismo, y tumores con histología broncoalveolar (11, 12). El caso 6 es representativo de la cohorte sensible al Gefitinib. Este paciente es un hombre de 32 años de edad, sin antecedentes de tabaquismo, que presentaba múltiples lesiones cerebrales y la enfermedad en el pulmón derecho se diagnosticó como carcinoma broncoalveolar. El paciente fue tratado con radioterapia total del cerebro, seguido por una serie de regímenes de quimioterapia a la que no respondió su tumor (carboplatino y gemcitabina; docetaxel; vinorelbina). Con un estado funcional tendiente a

15

20

25

30

empeorar y un agobio progresivo del tumor del pulmón, el paciente empezó la terapia con 250 mg por día de gefitinib. Su falta de aliento mejoró rápidamente y un escáner TC del pulmón 6 semanas después del inicio del tratamiento reveló la mejoría dramática que se muestra en la Figura 1.

Mutaciones del EGFR en aquellos que responden al gefitinib

5 Se formuló la hipótesis de que los casos de NSCLC con respuestas sorprendentes al gefitinib podrían albergar mutaciones somáticas en el *EGFR*, lo que indica el papel esencial desempeñado por esta ruta de señalización del factor de crecimiento en estos tumores. Para buscar tales mutaciones, primero se analizaron los reordenamientos dentro del dominio extracelular del EGFR que son característicos de los gliomas (15): no se detectó ninguno. Por lo tanto, se secuenció toda la región de codificación del gen usando amplificación por PCR de los exones individuales.

10 No se observaron mutaciones heterocigóticas en 8 de los 9 casos, todos los cuales fueron agrupados dentro del dominio quinasa del EGFR (Tabla 2 y Figura 2). Cuatro tumores tenían supresiones en el marco por la remoción de los aminoácidos 746 - 750 (delE756-A750; caso 1), 747 a 750 (delL747-T751insS; caso 2), y 747 a 752 (delL747-P753insS; casos 3 y 4). Las dos últimas supresiones se asociaron con la inserción de un residuo de serina, resultante de la generación de un nuevo codón en el rompimiento de la supresión. Sorprendentemente, estas cuatro

15 supresiones se superpusieron, con la supresión de cuatro aminoácidos (leucina, arginina, ácido glutámico y alanina, en los codones 747 a 750) dentro del exón 19 compartido por todos los casos (véase la Figura 4a). Otros tres tumores tenían sustituciones de aminoácidos en el exón 21: leucina por arginina en el codón 858 (L858R; casos 5 y 6), y leucina por glutamina en el codón 861 (L861Q; caso 7). La mutación L861Q es de particular interés, ya que el mismo cambio de aminoácidos en el gen *egfr* de ratón es responsable por el rasgo de piel oscura (*dsk5*), asociado con la señalización del EGFR alterado (18). Una cuarta mutación de sentido erróneo en el dominio quinasa dio lugar a una sustitución de glicina por cisteína en el codón 719 dentro del exón 18 (G719C; caso 8). Estaba disponible tejido normal emparejado para los casos de 1, 4, 5 y 6, y mostró sólo la secuencia de tipo silvestre, lo que indica que las mutaciones habían surgido somáticamente, durante la formación del tumor. No se observaron mutaciones en siete casos de NSCLC que no lograron responder al gefitinib (P = 0,0007; prueba exacta de Fisher bilateral).

25 Prevalencia de mutaciones específicas del EGFR en NSCLC y otros tipos de cáncer

A diferencia de los gliomas, en los que los reordenamientos que afectan al dominio extracelular del EGFR han sido estudiados extensamente (15), la frecuencia de las mutaciones del *EGFR* en NSCLC no ha sido definida. Por lo tanto, se secuenció toda la región de codificación del gen en 25 casos primarios de NSCLC no relacionados con el estudio del gefitinib, incluyendo 15 con histología broncoalveolar, que se ha asociado con sensibilidad al gefitinib en ensayos clínicos previos (11, 12). Se detectaron mutaciones heterocigotas en dos tipos de cáncer broncoalveolar.

30 Ambos casos tenían supresiones en el marco en el dominio quinasa idénticas a aquellas encontrados en aquellos que responden al gefitinib, a saber delL747-P753insS y delE746-A750 (Tabla 2). Dada la aparente agrupación de mutaciones de *EGFR*, se secuenciaron los exones 19 y 21 en un total de 55 tumores primarios y 78 líneas celulares derivadas de cáncer, que representan diversos tipos de tumores (véase el Material complementario). No se detectaron mutaciones, lo que sugiere que estas surgen sólo en un subconjunto de cánceres, en los que la señalización de EGFR pueden jugar un papel crítico en la tumorigénesis.

Aumento en la activación inducida por EGF y la inhibición por gefitinib de las proteínas del EGFR mutante

Para estudiar las propiedades funcionales codificadas por estas mutaciones, se expresaron la supresión de L747-S752insS y los mutantes de sentido erróneo L858R en células cultivadas. La transfección transitoria de los constructos mutantes y de tipo silvestre en células Cos-7 demostró niveles de expresión equivalentes, lo que indica que las mutaciones no afectan la estabilidad de la proteína. Se cuantificó la activación del EGFR mediante la medición de la fosforilación del residuo de tirosina¹⁰⁶⁸, comúnmente usado como un marcador de la autofosforilación del receptor (19). En la ausencia de factores de crecimiento asociados y en suero, ni el EGFR de tipo silvestre ni el mutante demostraron autofosforilación (Figura 3a). Sin embargo, la adición de EGF condujo a un aumento de 2-3

45 veces en la activación del receptor tanto para los mutantes del *EGFR* de supresión y de sentido erróneo, en comparación con el receptor de tipo silvestre. Por otra parte, mientras que la activación del EGFR normal estaba subregulada después de 15 min, en forma consistente con la internalización del receptor, los dos receptores mutantes demostraron activación continua hasta por 3 horas (Figura 3a). Se obtuvieron resultados similares con anticuerpos que miden el total de la fosforilación del EGFR después de la adición de EGF (no se muestra).

50 Ya que 7 de 8 mutaciones de quinasa del EGFR residen cerca de la hendidura del ATP, que está dirigida por el gefitinib, se determinó si las proteínas mutantes habían alterado la sensibilidad con el inhibidor. Se midió la autofosforilación del receptor inducida por EGF en las células pretratadas con concentraciones variables de gefitinib. Sorprendentemente, ambos receptores mutantes mostraron un aumento de la sensibilidad con la inhibición por gefitinib. El EGFR de tipo silvestre tenía una IC₅₀ de 0,1 µM y mostró una inhibición completa de la autofosforilación con 2 µM gefitinib, mientras que las dos proteínas mutantes tenían una IC₅₀ de 0,015 µM y la anulación de la autofosforilación con 0,2 µM (Figura 3b). Esta diferencia en la sensibilidad al fármaco puede ser clínicamente relevante, ya que los estudios farmacocinéticos indican que la administración oral diaria de 400 - 600 mg de gefitinib

da como resultado una concentración estacionaria mínima en plasma de 1,1 - 1,4 µM, mientras que la dosis diaria recomendada actualmente de 250 mg conduce a una concentración mínima de 0,4 µM (20).

Ejemplo 2

- 5 Las células tumorales que albergan mutaciones dentro del dominio quinasa del EGFR, y por lo tanto son sensibles a la inhibición del crecimiento por el tratamiento con gefitinib, pueden experimentar mutaciones en un "segundo sitio", también dentro del dominio quinasa, que confieren resistencia al gefitinib pero que aún se "activan" en el sentido de que presentan un aumento de señalización del EGFR con respecto al EGFR de tipo silvestre. Tales mutantes resistentes al gefitinib se generan a partir de dos líneas celulares de NSCLC humano esporádico a saber NCI-1650 y NCI-1975. Cada línea celular contiene una mutación heterocigota con el dominio quinasa del EGFR, y, por lo tanto, se espera que sea sensible al gefitinib. La mutación del EGFR en NCI-1650 consiste en una supresión en el marco de 15 nucleótidos en la posición 2235 - 2249 (delLE746-A750) en el exón 19, mientras que NCI-1975 tiene una mutación en sentido erróneo en el exón 21 que sustituye una G por T en el nucleótido 2573 (L858R). La mutación L858R en NCI-H1975 se ha demostrado en este documento que se activa y que confiere un aumento de sensibilidad al gefitinib in vitro.
- 10
- 15 Las líneas de células resistentes al gefitinib, derivadas tanto de NCI-1650 como de NCI-1975 se aíslan, después de mutagénesis química aleatoria usando EMS (metanosulfonato de etilo) seguido por el cultivo en medio suplementado con gefitinib para seleccionar el resultado de los clones resistentes. El subcultivo de los clones individuales es seguido por la determinación de la secuencia de nucleótidos del gen EGFR después de la amplificación específica mediada por PCR del ADN genómico correspondiente al dominio quinasa del EGFR.
- 20 Una variación de esta estrategia implica el paso en serie de estas dos líneas celulares en presencia de concentraciones gradualmente crecientes de gefitinib en el transcurso de varias semanas o meses con el fin de seleccionar la adquisición espontánea de mutaciones en el gen EGFR que confieren resistencia al gefitinib. Las células seleccionadas (que continuarán proliferando a una concentración relativamente alta de gefitinib) se aíslan en forma de colonias, y se identifican las mutaciones como se ha descrito anteriormente.

25 Ejemplo 3

- Para determinar si la mutación de tirosina quinasa del receptor desempeña un papel causal en el NSCLC, se buscaron alteraciones genéticas somáticas en una serie de 119 tumores primarios de NSCLC, que consisten en 58 muestras del Hospital Universitario de la ciudad de Nagoya en Japón y 61 del Hospital Brigham y de Mujeres en Boston, Massachusetts. Los tumores incluyeron 70 adenocarcinomas de pulmón y otros 49 tumores de NSCLC de 30 74 pacientes varones y 45 pacientes de sexo femenino, ninguno de los cuales había documentado tratamiento con inhibidores de quinasa del EGFR.

- Como una selección inicial, se amplifican y secuencian los exones que codifican los bucles de activación de 47 de los 58 genes de tirosina quinasa receptora humana (*) (Tabla S1) a partir de ADN genómico de un subconjunto de 35 58 muestras de NSCLC que incluye 41 adenocarcinomas de pulmón. Tres de los tumores, todos adenocarcinomas de pulmón, mostraron mutaciones de sentido erróneo heterocigotas en *EGFR* que no están presentes en el ADN de tejido pulmonar normal de los mismos pacientes (Tabla S2; S0361, S0388, S0389). No se detectaron mutaciones en amplicones de otros genes de la tirosina quinasa receptora. Todos los tres tumores tenían la misma mutación de *EGFR*, que se predijo que cambia la leucina ("L") en la posición 858 por arginina ("R") (Figura 6A; CTG → CGG; "L858R"), en donde toda la numeración se refiere a EGFR humano.

- 40 A continuación se examinaron los exones 2 al 25 del *EGFR* en la colección completa de 119 tumores de NSCLC. La secuenciación del exón de ADN genómico reveló mutaciones de sentido erróneo y la supresión de mutaciones del *EGFR* en un total de 16 tumores, todo dentro de los exones 18 a 21 del dominio quinasa. Todas las alteraciones de secuencia en este grupo fueron heterocigotas en el ADN del tumor; en cada caso, el tejido pulmonar normal aparejado del mismo paciente mostró una secuencia de tipo silvestre, lo que confirma que las mutaciones son de origen somático. La distribución de las alteraciones de las secuencias de nucleótidos y de proteínas, y las características del paciente asociadas con estas anomalías, se resumen en la Tabla S2.
- 45

- Las mutaciones de sustitución G719S y L858R se detectaron en dos y tres tumores, respectivamente. La mutación "G719S" cambia la glicina (G) en la posición 719 por serina (S) (Figura 6B). Estas mutaciones se localizan en el motivo GXGXXG (SEQ ID NO: 490) del dominio de enlazamiento de trifosfato del nucleótido o bucle P y adyacente al motivo DFG altamente conservado en el bucle de activación (52), respectivamente. Véase, por ejemplo, la Figura 7. Los residuos mutados son casi invariables en todas las proteínas quinasa y los residuos análogos (G463 y L596) en la proteína serina-treonina quinasa B-Raf son somáticamente mutados en carcinoma colorrectal, de ovario y de pulmón (41, 53) (Figura 6A, 6B).
- 50

También se detectaron múltiples mutaciones de supresión agrupadas en la región que abarca los codones 746 a 759 dentro del dominio quinasa del EGFR. Diez tumores transportaban uno de las dos supresiones de 15 nucleótidos que se superponen eliminando los codones del EGFR 746 - 750, a partir ya sea del nucleótido 2235 o 2236 (Del-1; Figuras 6C y 8C, Tabla S2). El ADN del EGFR de otro tumor mostró una brecha de 24 nucleótidos heterocigotos que conduce a la supresión de los codones 752 - 759 (Del-2; Figura 6C). Los cromatogramas representativos se muestran en las Figuras 8A - 8F.

Las posiciones de las mutaciones de sustitución y la supresión Del-1 en la estructura tridimensional de la forma activa del dominio quinasa del EGFR (54) se muestran en la Figura 7. Obsérvese que las alteraciones de la secuencia se agrupan alrededor del sitio activo de la quinasa, y que las mutaciones de sustitución se encuentran en el bucle de activación y el bucle P rico en glicina, elementos estructurales que se sabe que son importantes para la autorregulación en muchas proteína quinasa (52).

Se han identificado dos mutaciones adicionales del EGFR en dos tipos de tumores diferentes. Es decir, se ha identificado la mutación G857V del *EGFR* en la leucemia mielógena aguda (AML) y la mutación L883S del *EGFR* en un sarcoma metastásico. La mutación "G857V" tiene la glicina (G) en la posición 857 sustituida con una valina (V), mientras que la mutación "L883S" tiene la leucina (L) en la posición 883 sustituido con una serina (S). Estos hallazgos sugieren que se producen mutaciones en EGFR en varios tipos de tumores y, lo más importante, que los inhibidores del EGFR serían eficaces en el tratamiento de los pacientes portadores de tales mutaciones. Esto expande el uso de inhibidores de quinasa tales como, por ejemplo, los inhibidores de la tirosina quinasa gefitinib (comercializada como IressaTM), erlotinib (comercializado como TarcevaTM), y similares, en el tratamiento de otros tipos de tumores diferentes al NSCLC.

Las mutaciones del *EGFR* muestran una notable correlación con las características de los pacientes diferenciales descritas en las poblaciones de pacientes japonesas y de los Estados Unidos. Como se señaló anteriormente, los ensayos clínicos revelan una variabilidad significativa en la respuesta al inhibidor de tirosina quinasa gefitinib (IressaTM), con mayores respuestas observadas en los pacientes japoneses que en una población predominantemente europea (27,5% versus 10,4%, en un ensayo de fase II multi-institucional) (48); y con respuestas parciales observadas con más frecuencia en mujeres no fumadoras en los Estados Unidos y en pacientes con adenocarcinomas (49 - 51). Se demuestra que las mutaciones del *EGFR* fueron más frecuentes en los adenocarcinomas (15/70 o 21%) que en otros NSCLC (1/49 o 2%); más frecuente en mujeres (9/45 o 20%) que en hombres (7/74 o 9%), y más frecuentemente en los pacientes de Japón (15/58 o 26%, y 14/41 con adenocarcinomas o 32%) que en aquellos de los Estados Unidos (1/61 o 2%, y 1/29 con adenocarcinomas o 3%). Se observó la fracción más alta de mutaciones del EGFR en las mujeres japonesas con adenocarcinoma (8/14 o 57%). En particular, las características de los pacientes que se correlacionan con la presencia de mutaciones del EGFR parecen ser aquellas que se correlacionan con la respuesta clínica al tratamiento con gefitinib.

Para investigar si las mutaciones del *EGFR* pueden ser un factor determinante de la sensibilidad al gefitinib, se obtuvieron muestras de NSCLC antes del tratamiento de 5 pacientes que respondieron y 4 pacientes que progresaron durante el tratamiento con gefitinib, donde estos pacientes se identificaron de un total de más de 125 pacientes tratados en el Instituto del Cáncer Dana-Farber, ya sea en un programa de acceso expandido o después de la aprobación reglamentaria del gefitinib (49). Cuatro de los pacientes tuvieron respuestas radiográficas parciales ($\geq 50\%$ de regresión tumoral en una tomografía computarizada después de 2 meses de tratamiento), mientras que el quinto paciente experimentó dramática mejoría de los síntomas en menos de dos meses. Todos los pacientes eran de los Estados Unidos y caucásicos.

Aunque la secuenciación del dominio quinasa (exones 18 a 24) no reveló mutaciones en los tumores de los cuatro pacientes cuyos tumores progresaron con gefitinib, los cinco tumores de pacientes sensibles a gefitinib albergaban mutaciones del dominio quinasa del EGFR. La prueba de Chi cuadrado reveló la diferencia en la frecuencia de la mutación del *EGFR* entre aquellos que respondieron al gefitinib (5/5) y los que no respondieron (0/4) que es estadísticamente significativa con $p = 0,0027$, mientras que la diferencia entre quienes respondieron al gefitinib y pacientes estadounidenses no seleccionados con NSCLC (5/5 frente a 1/61) también fue significativa con $p < 10^{-12}$ (*). La mutación L858R del EGFR, observado previamente en los tumores no seleccionados, se identificó en un adenocarcinoma de pulmón sensible a gefitinib (Figura 6A; Tabla S3A, IR3T). Tres tumores sensibles a gefitinib contenían supresiones heterocigotas en el marco (Fig. 6C y Tablas S3A y S3B, Del-3 en dos casos y Del-4 en uno) y uno contenía una supresión homocigota en el marco (Fig. 6C y Tablas S3A y S3B, Del-5). Cada una de estas supresiones estaba dentro de la región del codón 746 - 753 del *EGFR*, donde también se encontraron supresiones en tumores no seleccionados. Cada una de estas tres supresiones también se asocia con una sustitución de aminoácidos (Tablas S3A - S3C). En las cuatro muestras donde el tejido normal coincidió, se confirmaron estas mutaciones como somáticas.

Ejemplo 3A: Diseño del cebador

Las secuencias de ADNc de tirosina quinasas receptoras se obtuvieron a partir del GenBank (números de acceso enumerados en la Tabla S1), y fueron a la formación del genoma humano (<http://genome.ucsc.edu>) utilizando la alineación BLAT para identificar los límites del exón / intrón. Se diseñaron pares de cebadores específicos del gen externo para amplificar secuencias de exón y al menos 250 pb de secuencia intrónica de flanqueo o secuencia exónica adyacente en cada lado utilizando el programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html). Los amplicones resultantes predichos se utilizaron entonces para diseñar cebadores internos que flanquean el exón (generalmente mayor de 50 pb desde el límite del exón / intrón) y que contienen anexas colas de cebador hacia adelante e inversas M13. Estos conjuntos de cebadores anidados se pusieron a prueba para el tamaño adecuado del amplicón y la secuencia de alta calidad a partir del ADN de control. Los amplicones que abarcan exones que codifican el bucle de activación de tirosina quinasa receptora de 47 tirosina quinasas se amplificaron y secuenciaron en un conjunto de 58 muestras de cáncer de pulmón primario de la escuela de medicina de la Universidad de la Ciudad de Nagoya. Además, los amplicones que cubren toda la longitud del EGFR también fueron amplificados.

Ejemplo 3B: Métodos PCR y de secuenciación de ADN genómico

Los exones de la tirosina quinasa y las secuencias intrónicas de flanqueo fueron amplificados utilizando cebadores específicos en una disposición de PCR anidado en formato de 384 pozos. Cada reacción PCR contenía 5 ng de ADN, 1X de amortiguador HotStar, los dNTP de 0,8 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,2 U de Enzima HotStar (Qiagen, Valencia, CA), y cebadores hacia delante e inversos 0,2 μM en un volumen de reacción de 10 μl. Los parámetros de los ciclos de PCR fueron: un ciclo de 95° C durante 15 min, 35 ciclos de 95° C durante 20 s, 60° C durante 30 s y 72° C durante 1 min, seguido de un ciclo de 72° C durante 3 min.

Los productos PCR resultantes se purificaron por medio de química de inmovilización reversible en fase sólida seguida por secuenciación fluorescente terminadora de coloración bidireccional con cebadores universales M13. Los fragmentos de secuenciación se detectaron a través de electroforesis capilar utilizando un analizador de ADN ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se llevaron a cabo una PCR y secuenciación por parte de Agencourt Bioscience Corporation (Beverly, MA).

Ejemplo 3B: Análisis de secuencias y validación

Se analizaron Cromatogramas hacia adelante (F) e inversos (R) fueron analizadas por lotes por medio del Mutation Surveyor 2.03 (SoftGenetics, State College, PA), seguido por una revisión manual. Las variaciones en la secuencia de alta calidad que se encuentran en una o ambas direcciones se anotaron como mutaciones candidatas. Se volvieron a amplificar los exones que albergan mutaciones candidatas a partir de la muestra original de ADN y se volvió a secuenciar como anteriormente.

Ejemplo 3C: Los pacientes

Los especímenes de tumor de pulmón se obtuvieron de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas tratados en el Hospital de la Universidad de la Ciudad de Nagoya y el Hospital Brigham y de Mujeres (tumores de japoneses no seleccionados y tumores de estadounidenses tratados con gefitinib, respectivamente) y del banco de tumores anónimos del Hospital Brigham y de Mujeres (muestras de estadounidenses no seleccionadas) bajo estudios aprobados de la Junta de Revisión Institucional. La información sobre el género, la edad, y la histología estaba disponible para la mayoría de las muestras. Las muestras de pacientes también fueron obtenidas de pacientes tratados en un ensayo clínico de etiqueta abierta de gefitinib en el Instituto del Cáncer Dana-Farber (13). Las respuestas al gefitinib se definieron mediante criterios estándar (Véase, por ejemplo, AB Miller, B. Hoogstraten, M. Staquet, A. Winkler, 1981 Cancer 47, 207 - 14). Se obtuvo la aprobación del IRB para estos estudios.

De los pacientes que responden al gefitinib, hubo dos pacientes que habían sido tratados previamente con al menos un ciclo de quimioterapia, un paciente previamente tratado con terapia de radiación, un paciente tratado al mismo tiempo con quimioterapia, y un paciente que no recibió ningún otro tratamiento. Para los pacientes no sensibles al gefitinib, el fracaso del tratamiento se definió como la aparición de nuevas lesiones tumorales o el crecimiento de lesiones tumorales existentes en una tomografía computarizada después de 2 meses de tratamiento con gefitinib en comparación con una tomografía computarizada de línea de base.

Ejemplo 3D: Secuenciación de ADNc de muestras de los pacientes

Se aisló ARN total a partir de muestras de tejido utilizando Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se purificó usando un kit de limpieza de minieluato ARNeasy™ (Qiagen, Valencia, CA). Se transcribe ADNc a partir de 2 μg de ARN total con transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADNc se usa como molde para amplificaciones posteriores por PCR del EGFR.

Los componentes de la PCR son: Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP

5 cada uno 0,2 μ M, 0,2 μ M de cada cebador, y 0,05 unidades / μ l de Taq polimerasa (Taq Platinum, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). La amplificación del fragmento "a" requiere la adición de DMSO al 4% a la reacción. Las secuencias de cebadores se enumeran en la Tabla S4. Los cebadores hacia adelante e inversos se sintetizan con 18 pares de bases de secuencias hacia delante e inversas de M13 que sobresalen, respectivamente. Las condiciones de los ciclos térmicos son: 94° C, 4 min, seguido por 11 ciclos, con una etapa de desnaturalización a 94° C durante 20 s, una etapa de extensión a 72° C durante 20 s, y con una etapa de hibridación de 20 s que disminuyó 1° C / ciclo, desde 60° C en un ciclo hasta 50° C en el ciclo de 11; se repitió luego el ciclo 11, 25 veces. Una incubación de 6 minutos a 72° C seguida de un remojo a 4° C completan el programa.

10 Una parte alícuota de la reacción de PCR se diluye en proporción 1:50 con agua. El producto de PCR diluido se secuenció usando un kit cebador M13 Forward Big Dye (Perkin-Elmer / Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los productos de secuenciación se separan en un secuenciador fluorescente (modelo 3100 de Applied Biosystems, Foster City, CA). Las llamadas de bases se realizan mediante el software del instrumento, y se revisan por medio de inspección visual. Cada secuencia se compara con la secuencia normal correspondiente utilizando el software Sequencher 4.1 (Gene Codes Corp.).

15 **Ejemplo 3E:** Tipos de tumores que expresan EGFR mutante

Se encontraron dos mutaciones adicionales en EGFR en dos tipos de tumores diferentes. Se identificó una mutación del EGFR que sustituye una glicina (G) con una valina (V) en posición 857 ("G857V") en leucemia mielógena aguda (AML). Una mutación EGFR que sustituye una leucina (L) con una serina (S) en posición 883 ("L883S") en un sarcoma metastásico.

20 **Ejemplo 3F:** Líneas celulares

25 Se examinaron los efectos del gefitinib sobre líneas de células de NSCLC. Una línea celular, H3255, fue particularmente sensible al gefitinib, con una IC₅₀ de 40 nM. Otras líneas celulares tenían IC₅₀ mucho más altos. Por ejemplo, una línea celular de tipo silvestre H1666 tiene un IC₅₀ de 2 μ M, que es 50 veces mayor que para la línea celular mutante. Cuando se secuenció el EGFR de esta línea celular, contenía la mutación de sentido erróneo L858R, mientras que las otras líneas celulares eran de tipo silvestre para EGFR. Se requirieron concentraciones mucho menores de gefitinib para desactivar la fosforilación de EGFR y también AKT y ERK por medio del EGFR en comparación con las células de tipo silvestre para EGFR, que requieren al menos concentraciones 100 veces más altas de gefitinib para lograr el mismo efecto. Estos hallazgos sugieren que el receptor mutante es más sensible a los efectos del gefitinib.

30 También téngase en cuenta aquí,

Ejemplo 3G: Terapias de combinación

35 Se analizaron especímenes tumorales de pacientes con NSCLC avanzado tratados en un ensayo aleatorio de carboplatino / paclitaxel con o sin erlotinib. La porción clínica de este ensayo demostró una supervivencia equivalente en los dos brazos del tratamiento. Se encontraron disponibles especímenes tumorales para secuenciación de 228 de los 1076 pacientes. Las características clínicas preliminares de estos pacientes no son diferentes de las del grupo como un todo con respecto a los datos demográficos de referencia, la velocidad de respuesta, la supervivencia media y total.

Se secuenciaron los exones 18 - 21 del dominio tirosina quinasa y se identificaron 29 mutaciones, para una frecuencia de mutación de 12,7 por ciento.

40 En su conjunto, los pacientes con mutaciones del EGFR tienen una mejor supervivencia, independientemente de si recibieron tratamiento con quimioterapia únicamente o en combinación con erlotinib. Estas diferencias son estadísticamente significativas con un valor p de menos de 0,001. Estos resultados plantean la posibilidad de que las mutaciones del EGFR, además de ser predictores de la respuesta al gefitinib y al erlotinib, también pueden servir de pronóstico para una mejor supervivencia.

45 (*) Obsérvese que la frecuencia de mutación del EGFR en los pacientes estadounidenses no seleccionados, 1 de 61, parece ser menor en comparación con la frecuencia de la respuesta reportada al gefitinib de 10,4%. Esta diferencia tiene una importancia estadística moderada (p = 0,025 por medio del ensayo de chi-cuadrado). Por lo tanto este resultado podría aún deberse al azar, podría ser debido a una fracción de los que respondieron que no tienen mutaciones del EGFR, o podría deberse a una falla para detectar experimentalmente mutaciones del EGFR en esta colección de tumores. Si se compara la frecuencia de la mutación del EGFR en pacientes estadounidenses sensibles al gefitinib (5/5) con la frecuencia esperada de respuesta al gefitinib (10,4%), la probabilidad de chi-cuadrado es nuevamente menor a 10 - 12.

Ejemplo 4

Diseño del estudio:

5 Se realizó un estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes con NSCLC que se refiere a la secuenciación del dominio quinasa del *EGFR* somático desde agosto de 2004 hasta enero de 2005 en el Hospital General de Massachusetts (MGH), el instituto del cáncer Dana-Farber (DFCI) y el Hospital Brigham y de Mujeres (BWH). Estas tres instituciones comprenden Dana-Farber/Partners CancerCare (DF / PCC), un centro de cáncer académico asociado que atiende aproximadamente 1200 pacientes con cáncer de pulmón al año. En agosto de 2004, se encontraba disponible la secuenciación del dominio quinasa de *EGFR* para uso clínico en DF / PCC. Los médicos podrían seleccionar que pacientes remitir a las pruebas, sin embargo, los pacientes necesitan tener especímenes tumorales apropiados y suficientes disponibles. Las células tumorales tenían que comprender al menos 50% del espécimen con base en el examen histológico por parte de los patólogos de referencia del MGH y BWH, y el espécimen tenía que ser de una resección, biopsia broncoscópica, o biopsia con aguja gruesa de un tumor primario o metastásico, o un bloque de células de fluido pleural. En raros casos, se consideraron adecuadas las muestras aspiradas con aguja fina. Las muestras podrían ser o bien tejido embebido en parafina o congelado. Debido a la baja incidencia de mutaciones del *EGFR* en pacientes con tumores de células escamosas (62) con este diagnóstico, no fueron elegibles para el ensayo.

20 Se identificaron los pacientes sometidos a los ensayos del *EGFR* utilizando el registro del caso del *EGFR* mantenido en el Laboratorio de Medicina Molecular (LMM), de la Escuela de Medicina de Harvard / Partners HealthCare Center for Genetics y Genomics (CLIA # 22D 1005307), el centro de análisis de diagnóstico en donde se realizaron e interpretaron todas las secuenciaciones. Se incluyeron todos los pacientes referidos para análisis del *EGFR* de DF / PCC con un diagnóstico de NSCLC durante el período del estudio.

25 Se recolectaron datos del paciente como edad, género y raza del sistema electrónico de registro médico. Se documentaron datos como el consumo de tabaco, antecedentes de cáncer, resultados de la secuenciación del dominio quinasa de *EGFR*, y los posteriores planes de tratamiento del *EGFR*-TKI utilizando una revisión estructurada del médico. Específicamente, se obtuvieron la condición de fumador y antecedentes de cáncer de las notas médicas y de enfermería. Los ex fumadores se definieron como pacientes que habían dejado de fumar al menos un año antes del diagnóstico de cáncer de pulmón y los no fumadores se definieron como pacientes que habían fumado menos de 100 cigarrillos en su vida. Los fumadores que habían dejado de fumar al año de su diagnóstico o que estaban fumando en el momento del diagnóstico fueron clasificados como fumadores actuales. Se calcularon los paquetes fumados al año multiplicando el número de paquetes fumados por día por el número de años como fumador. Se obtuvieron los resultados de la histología tumoral y de la secuenciación del dominio quinasa del *EGFR* a partir de los reportes de patología. Todas las muestras de patología fueron revisadas en un solo sitio, ya sea en el MGH o en el BWH y se categorizó la histología utilizando el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), (63). Los planes posteriores de tratamiento se obtuvieron de las notas del médico.

35 Los datos completos estaban disponibles para edad, género, histología del tumor, y el estado de mutación del *EGFR*. Se perdieron datos para la raza (12%), estado del tumor en el momento del análisis (4%), estatus de fumador (6%), tratamientos previos (5%), y planes de tratamiento posteriores del *EGFR*-TKI (11%). Este estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de DF / PCC.

Secuenciación del gen *EGFR*:

40 Se cortaron secciones seriales ya sea de tejido tumoral embebido en parafina (FFPE), fijado en formalina o congelado y se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio. Se identificó una región de tejido tumoral que consistía de al menos 50% de células tumorales viables por parte de un patólogo. Se extrajeron muestras de FFPE con etanol y xileno para remover la parafina. Se digirieron tanto las muestras de tejido congelados como las FFPE con proteinasa K durante la noche. Se extrajo el ácido desoxirribonucleico genómico (ADN) del tejido y de sangre entera periférica utilizando procedimientos estándar. Se extrajo el ADN genómico de muestras de saliva utilizando el kit para saliva de ADN Genotek-Oragene™.

50 Se amplificó el dominio quinasa del *EGFR* (exones 18 - 24 y las regiones intrónicas de flaqueo) en un conjunto de reacciones de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR). Los cebadores utilizados en las ampliificaciones de PCR anidada se describen en la Tabla S1A y B y la SEQ ID 1 - 424 con la adición de secuencias universales a los extremos 5' de los cebadores (5'-tgtaaacgacgcccagt) (SEQ ID NO: 645). Se secuenciaron directamente los productos PCR en forma bidireccionalmente por medio de la secuenciación terminadora de coloración. Se realizó la PCR en una placa de 384 pozos en un volumen de 15 µl que contenía 5 ng de ADN genómico, MgCl₂ 2 mM, 0,75 µl de DMSO, Betaína 1 M, los dNTP 0,2 mM, 20 pmoles de cebadores, 0,2 µl de AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), 1X amortiguador (suministrado con AmpliTaq Gold). Las condiciones de los ciclos térmicos fueron las siguientes: 95° C durante 10 minutos; 95° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos, 72° C durante 1 minuto durante 30 ciclos; y 72° C durante 10 minutos. Se purificaron los productos PCR

con perlas magnéticas Ampure® (Agencourt).

5 Los productos de la secuenciación se purificaron utilizando perlas magnéticas Cleanseq™ (Agencourt) y se separaron por medio de electroforesis capilar en un analizador de ADN ABI 3730 (Applied Biosystems). El análisis de secuencia se realizó por medio del Mutación Surveyor (SoftGenetics, State College, PA) y manualmente por medio de dos revisores. Se confirmaron las variantes de secuencia de ADN no sinónimas por medio del análisis de 3-5 reacciones PCR independientes de la muestra original de ADN genómico. Se analizaron muestras de sangre o saliva de individuos con variantes de secuencia de ADN no sinónimas para determinar si los cambios de secuencia eran exclusivos del tejido tumoral.

Análisis estadístico:

10 Se construyeron modelos de regresión logística para evaluar la asociación univariada entre características demográficas y clínicas del paciente y el estado de mutación del *EGFR*. Para identificar predictores significativos del status positivo de la mutación, se construyó un modelo de regresión logística multivariable que incluía variables independientes identificadas en estudios previos como predictores de mutaciones, específicamente género, raza, histología y condición de fumador. Se excluyeron seis pacientes de estos análisis debido a la falta de datos de mutaciones del *EGFR*, como resultado de un daño del PCR. Todos los análisis se realizaron utilizando un software estadístico SAS (versión 8.02, SAS Institute, Cary, NC).

Resultados:

Características de los pacientes:

20 Entre los 100 pacientes con NSCLC referidos para secuenciación del dominio quinasa del *EGFR* somático como parte del cuidado clínico del cáncer durante el período de estudio, la edad promedio fue de 60,7 años y el 63% eran mujeres (Tabla 4). La mayoría de los pacientes eran de raza blanca (76%) o asiáticos (7%), y tenían enfermedad metastática al momento de ordenar los análisis (67%). Casi todos los pacientes (94%) analizados para las mutaciones del *EGFR* tenían características de adenocarcinoma, adenocarcinoma con carcinoma broncoalveolar (BAC), o BAC puro. Aproximadamente un tercio de los pacientes nunca fueron fumadores. La terapia administrada antes de remitir a los pacientes para ensayos de *EGFR* incluían cirugía (50%), radioterapia torácica (22%), quimioterapia (47%), y terapia destinada dirigida al EGFR (11%).

Mutaciones identificadas:

30 El tiempo promedio desde la remisión para los análisis hasta la disponibilidad de los resultados fue de 12 días hábiles. La mayoría de los especímenes remitidos estaban embebidos en parafina (74%). Seis de los 74 especímenes embebidos en parafina (8%) fallaron en las amplificaciones de la PCR, mientras que todos los 26 especímenes congelados fueron amplificados con éxito. Entre los 94 pacientes con resultados interpretables, se encontró que 23 (24%) tenían al menos una mutación en el dominio quinasa del *EGFR*, con dos de estos pacientes demostrando dos mutaciones puntuales cada uno, para un total de 25 mutaciones identificadas (Tabla 5). Entre los 23 pacientes con mutaciones, 9 (39%) tenían una o más mutaciones puntuales, 12 (52%) tenían supresiones que se superponen en el marco en el exón 19 y dos pacientes (9%) tenía duplicaciones en el exón 20. Las mutaciones puntuales fueron en los exones 18 y 21, e incluían cinco 2573T> G (L858R), y uno de cada uno de 2126A> T (E709V), 2155G> A (G719S), 2156G> C (G719A), 2327G> A (R776H), 2543C> T (P848L) y 2582T> A (L861Q). Una de las mutaciones puntuales (P848L) fue detectada tanto en el espécimen tumoral como en las células mononucleares obtenidas de un hisopo bucal. No se detectaron mutaciones en los exones 22, 23, o 24.

40 Predictores de mutaciones:

45 En nuestro ejemplo, no hubo una asociación significativa entre el estado de mutación del *EGFR* y la edad ($p = 0,61$), género femenino ($p = 0,92$), raza asiática ($p = 0,08$), o enfermedad metastática al momento de la remisión ($p = 0,43$, Tabla 4). Se encontró que ninguno de los 6 pacientes con histología tumoral diferente a adenocarcinoma tiene mutaciones. Entre los pacientes con características de adenocarcinoma, adenocarcinoma con BAC y BAC puro, no hubo asociación entre las características BAC / BAC y el estado de mutación de *EGFR* ($p = 0,35$).

50 Se encontró que ninguno de los 17 fumadores actuales tiene una mutación. Los no fumadores eran más propensos a tener una mutación del EGFR que los ex fumadores (*odds ratio* [OR] = 3,08, intervalo de confianza del 95% [IC]: 1,09 a 8,76). El número promedio paquetes fumados al año fue significativamente menor entre los pacientes con mutación positiva del *EGFR* (0,7 paquetes al año) frente a los pacientes con mutación negativa del *EGFR* (25,0 paquetes al año, $p < 0,001$). Por cada paquete adicional fumado al año, hubo una disminución del 4% en la probabilidad de tener una mutación (OR = 0,96, IC del 95% 0,93 - 0,99).

El número de paquetes fumados al año sigue siendo un predictor significativo del status de mutación después de controlar el género, la raza y la histología del tumor (OR = 0,96, IC del 95%: 0,93 - 0,99).

Uso posterior de la información de la prueba:

5 Los pacientes con mutación positiva del *EGFR* fueron significativamente más propensos a tener planes documentados para recibir un tratamiento posterior de EGFR-TKI (86%) que los pacientes con mutación negativa del *EGFR* (11%, $p < 0,001$). Los médicos documentaron que los resultados del *EGFR* afectaron su priorización de las terapias recomendadas en un 38% de los casos. Estos casos incluyeron 14 (61%) de los 23 pacientes con mutación positiva para quienes se recomendó terapia de EGFR-TKI antes de lo que hubiera tenido que hacerse para
10 pacientes con mutación negativa, y 24 (34%) de los 71 pacientes mutación negativa para quienes la terapia de EGFR-TKI no fue recomendada o fue recomendada más tarde de lo que hubiera sido para pacientes con mutación positiva.

15 Era más probable que el estado de mutación del EGFR cambiara la priorización de las opciones de tratamiento en pacientes con enfermedad metastática (54%) que en pacientes con enfermedad local o localmente avanzada (19%, $p = 0,003$). Teniendo en cuenta este resultado, se analizó el proceso de toma de decisión en pacientes con metástasis (Figura 10). Entre los 31 pacientes con enfermedad metastática cuyos resultados del análisis afectaron las recomendaciones de tratamiento, se les ofreció a cinco pacientes de primera línea con mutación positiva el tratamiento de EGFR-TKI y se les ofreció a seis pacientes de segunda línea con mutación positiva el tratamiento de EGFR-TKI en lugar de quimioterapia. Se alentó a veinte pacientes con mutación negativa a aplazar el tratamiento de EGFR-TKI hasta un tratamiento de tercera línea o superior con base en sus resultados negativos de las pruebas de
20 *EGFR*. Entre los 26 pacientes con enfermedad metastática cuyos resultados de la prueba no afectaron las recomendaciones del tratamiento, dos pacientes con mutación negativa recibieron tratamiento de primera línea de EGFR-TKI a pesar de sus resultados negativos, nueve pacientes que incluían cuatro pacientes con mutación positiva recibieron tratamiento de segunda o tercera línea de EGFR-TKI y 15 pacientes, incluyendo dos pacientes con mutación positiva no recibieron una recomendación para un tratamiento de EGFR-TKI. Tres de los pacientes
25 con enfermedad metastática participaron en ensayos para evaluar la terapia de primera línea de EGFR-TKI. Nueve de los pacientes con enfermedad metastática habían recibido previamente o estaban recibiendo los EGFR-TKI al momento del análisis de *EGFR*.

Discusión:

30 Se estudiaron los primeros 100 pacientes con NSCLC para experimentar selección por las mutaciones somáticas del *EGFR* como parte del cuidado clínico del cáncer en nuestra institución y se encontró que el análisis era factible e impactó significativamente el tratamiento de los pacientes con NSCLC. Era significativamente más probable que los pacientes con mutaciones del *EGFR* recibieran recomendaciones para terapia de EGFR-TKI que los pacientes sin mutaciones. Los médicos ajustaron sus recomendaciones de tratamiento con base en los resultados del ensayo en
35 más de un tercio de los casos, y era más probable que lo hicieran en pacientes con enfermedad metastática. En nuestra muestra de pacientes, los médicos utilizaron resultados positivos de la prueba de EGFR para ayudarlos a tomar la decisión para priorizar los EGFR-TKI sobre la quimioterapia para algunos pacientes, especialmente para tratamiento de primera o segunda línea. Sin embargo, los resultados negativos de las pruebas de *EGFR* no impidieron que los médicos administraran los EGFR-TKI a pacientes seleccionados. Muchos de los pacientes en quienes los resultados de la prueba no impactaron en la toma de decisiones clínicas tenían enfermedad resacada en
40 etapa temprana o ya habían recibido una EGFR-TKI para enfermedad metastática al momento de la prueba. Esto es razonable ya que la utilidad de las EGFR-TKI como terapia adyuvante no se conoce y existe un beneficio con la terapia de EGFR-TKI en una cantidad pequeña de pacientes sin mutaciones identificadas de *EGFR* (65, 66 - 70, 71).

45 Nuestro estudio también proporciona evidencia de que el diagnóstico molecular puede mejorar la capacidad clínica para identificar pacientes con mutaciones del *EGFR*. Muchos oncólogos utilizan actualmente las características clínicas asociadas con mutaciones del *EGFR* y la respuesta a los EGFR-TKI para guiar el proceso de toma de decisiones para los pacientes con NSCLC. En efecto, nuestra población de pacientes remitidos para el ensayo del *EGFR* demostró un aumento de la prevalencia de tales características. Por ejemplo, 95% de los pacientes remitidos tenían adenocarcinoma o histología tumoral BAC, en comparación con 45% en la población general de NSCLC (72). Mientras que los no fumadores comprendían el 29% de nuestra población, la incidencia de los no fumadores en la
50 población general de NSCLC se ha reportado como el 2 - 10%, y puede ser tan alta como 27% en mujeres con NSCLC (73 - 75). Del mismo modo, nuestra población consistía en únicamente de 17% de fumadores actuales, en comparación con la tasa de 38 - 75% de fumadores actuales entre los pacientes con NSCLC recientemente diagnosticados (75, 78 - 80). Nuestra población clínicamente seleccionada tuvo como consecuencia una tasa de mutación del *EGFR* de 24%, que es sustancialmente superior las tasas documentadas por nosotros y por otros
55 grupos estadounidenses que analizaron muestras tumorales de NSCLC disponibles no seleccionadas (65 - 66, 81). Sin embargo, es importante señalar que mientras que los médicos parecían estar tratando de seleccionar pacientes para las pruebas que tenían las características clínicas de predicción de mutaciones del *EGFR*, la frecuencia de mutación era aún únicamente del 24%, destacando el hecho de que el diagnóstico molecular aumenta la información

disponible para la toma de decisiones clínicas.

5 El estatus de fumador fue el predictor más fuerte del estado de mutación del EGFR en nuestros pacientes, con un aumento del historial de tabaquismo asociado a una significativa disminución de la probabilidad de albergar una mutación del EGFR, después de controlar predictores previamente descritos del estado de mutación. Nuestros resultados son consistentes con otra serie de casos que documentan la importancia de la condición de fumador en la probabilidad de mutaciones del *EGFR* (66, 69, 70, 81, 82). Al igual que la extremadamente baja prevalencia de mutaciones del EGFR en tumores de células escamosas (62) se han desplazado los esfuerzos de los análisis hacia los tumores de adenocarcinoma, puede ser apropiado enfocar los esfuerzos futuros sobre los pacientes con un historial bajo o nulo de tabaquismo. Sin embargo, los informes de mutaciones de *EGFR* en pacientes sin características clínicas típicas desaconsejan las limitaciones estrictas de los análisis (83). Cuando se examinan las otras características clínicas que se cree que están asociadas con las mutaciones, se encontró que la histología tumoral BAC y de raza asiática no tienen tendencias significativas para predecir el estado de mutación del *EGFR*. La falta de significancia estadística en estas asociaciones puede ser debido al pequeño tamaño de la muestra.

15 La prueba era factible y se adapta a las limitaciones de tiempo de cuidado clínico del cáncer. Casi todos los tumores enviados para análisis produjeron resultados interpretables. Las seis muestras que fallaron la amplificación por PCR estaban todas embebidas en parafina, mientras que ninguno de los especímenes congelados falló en la amplificación por PCR. Cuando está disponible, el tejido fresco congelado es el sustrato preferible para pruebas de mutación del *EGFR*.

20 Se han reportado cerca de 2.500 muestras de NSCLC que hasta el momento han sido sometidos a análisis de secuencia del EGFR parcial o completo. Nuestros pacientes demostraron mutaciones similares a los informes anteriores, con la superposición de las supresiones del exón 19 de 9 - 23 pares de bases y mutaciones puntuales que conducen a sustituciones de aminoácidos individuales en los exones 18 y 21. Se encontró que cinco de las mutaciones puntuales han sido descritas anteriormente (E709V, G719S, G719A, L858R, y L861Q). Se encontró que una de las mutaciones puntuales provoca una sustitución de aminoácido en un codón donde se ha descrito previamente una sustitución de aminoácidos diferente (R776H). Se encontró que cada una de las variantes E709V y R776H en combinación con una mutación conocida que sensibiliza al gefitinib que involucra al codón 719. Se encontró que la mutación P848L en el exón 21 tanto en muestras somáticas como bucales, lo que sugiere que puede ser una variante de línea germinal de significado incierto. La paciente era una mujer no fumadora con adenocarcinoma que tenía enfermedad estable durante 15 meses en tratamiento con gefitinib, antes de la prueba de mutación del EGFR. Cuando se reveló la mutación P848L, se le había encontrado recientemente que tiene una enfermedad progresiva y se inició el tratamiento con erlotinib. No existe información disponible acerca de la respuesta al erlotinib hasta el momento.

35 Los solapamientos de la supresión (2253_2276 del) describieron previamente las supresiones del exón 19. Las supresiones en nuestros pacientes se pueden clasificar en uno de dos grupos: aquellos codones que abarcan 747-749 como mínimo (secuencia de aminoácidos LRE), y aquellos codones que abarcan 752 - 759 (Figura 11). El análisis de todas las supresiones del exón 19 reportados hasta la fecha sugiere que una amplia variedad de aminoácidos se puede eliminar de la región TK que abarca los codones 747 - 759. No parece ser un codón común requerida suprimido; sin embargo, todas las supresiones detectadas mantenían un residuo de lisina en la posición 745.

40 Una de las dos mutaciones del exón 20 están en una mujer no fumadora con adenocarcinoma recurrente que fue tratado con erlotinib después de que se realizó una prueba de EGFR y ha tenido enfermedad estable durante dos meses en este momento. El otro es un hombre ex-fumador con adenocarcinoma metastásico que fue tratado con un EGFR-TKI, pero no pudo tolerarlo debido a una erupción cutánea severa. La identificación de mutaciones de EGFR clínicamente relevantes en el exón 20 subraya la importancia de la secuenciación completa de la región TK del EGFR.

50 En conclusión, este estudio demuestra la viabilidad y la utilidad de la detección integral de la región TK del gen EGFR para mutaciones somáticas en pacientes con NSCLC como parte de la atención clínica del cáncer. El resultado de la prueba proporciona información útil con respecto a los predictores clínicos de respuesta a EGFR-TKI. Los fumadores actuales son menos propensos a albergar una mutación, al igual que los ex fumadores con un alto número de paquetes al año de historia de tabaquismo.

Ejemplo 5

Análisis del gen EGFR para cáncer de pulmón de células no pequeñas, un procedimiento operativo estándar.

Indicaciones clínicas:

Esta prueba está indicada para las personas con cáncer pulmonar de células no pequeñas.

Principio analítico

5 La prueba de gen *EGFR* es una prueba genética que detecta mutaciones en el dominio quinasa del *EGFR*. Se obtiene primero ADN a partir de una biopsia de tumor. La secuencia de ADN de 7 exones (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) del *EGFR* se determina entonces por medio de secuenciación génica bidireccional directa. Se compara luego la secuencia obtenida con la secuencia conocida del *EGFR* para identificar cambios de la secuencia de ADN. Si se detecta un cambio de secuencia de ADN en el tejido tumoral, la prueba se repetirá en la muestra de tejido original. Si no ha sido previamente reportado el cambio en alguien que responde al gefitinib o erlotinib, la prueba también se llevará a cabo con una muestra de sangre del individuo para determinar si la mutación es constitutiva (y por lo tanto probablemente ocurra normalmente un polimorfismo) o se ha producido de forma somática en el tejido tumoral.

10 Requerimientos del espécimen:

Se requiere un mínimo de 100 ng de ADN de la muestra de tejido. Nota: se pueden extraer cantidades extremadamente pequeñas de ADN de muestras de tejido. La concentración de este ADN no se puede cuantificar con precisión.

Control de calidad:

15 Controles utilizados

Se incluyen dos controles negativos (agua) y un control positivo (ADN humano) para cada exón en las reacciones PCR. El control negativo debe proceder a través de todo el procedimiento para asegurar que la secuencia obtenida no es el resultado de una contaminación. Un control positivo pGEM y un control del matriz ABI están incluidos en la etapa de secuenciación.

20 Preparación y almacenamiento del control:

El control positivo para PCR es o bien ADN humano Clontech o ADN humano a partir de una muestra de sangre anónima y se almacena a 4° C. El control negativo para la reacción PCR es agua grado biológico de HyPure Molecular almacenada a temperatura ambiente. El control de la reacción de secuenciación positivo pGEM y el control de la matriz ABI se almacenan a 20° C.

25 Límites de tolerancia y pasos a seguir si se produce un error de control individual:

30 Si el control positivo de PCR falla, pero los controles negativos y las muestras pasan, los resultados de la PCR se considerarán que pasan y se llevara a cabo la secuenciación. Si un control negativo muestra evidencia de amplificación de ADN, se repetirá toda la reacción con una nueva parte alícuota de ADN del paciente. Si el control pGEM falla y las reacciones de las pruebas fallan, la ejecución de la secuenciación se repetirá con una segunda alícuota del producto de PCR. Si los controles de secuenciación fallan, pero las reacciones de prueba pasan la no necesita ser repetida la secuenciación. NOTA: Debido al baja rendimiento de la extracción de ADN a partir de muestras de tejidos embebidos en parafina, las reacciones de PCR externos a menudo no producen productos visibles. Las reacciones internas PCR deben producir productos visibles. El tamaño del producto detectado en el gel debe ser comparado con los tamaños esperados (véase más adelante) para asegurar que el producto de PCR apropiada se ha obtenido. Si un producto de PCR interno no es visible en el gel, se deben repetir las fallas de la PCR específicas del exón.

40 Si la amplificación de la PCR de una muestra individual falla, una nueva ronda de PCR se debe intentar con un aumento de dos veces en el molde de entrada de ADN. Si la amplificación de la PCR falla nuevamente, se debe adquirir una nueva muestra de ADN para ese paciente si está disponible. Si la muestra era una muestra de tejido embebido en parafina, se deben obtener muestras adicionales. Si se encuentran disponibles, se deben obtener más muestras que las utilizadas para generar la muestra original y se debe permitir la digestión en proteinasa K durante tres noches.

Equipos y reactivos (todos los reactivos estables durante un año a menos que se indique lo contrario)

45 PCR y secuenciación (en general, el equipo y los reactivos para PCR y secuenciación son conocidos por aquellos capacitados en la técnica y pueden ser utilizados en este documento, como se señaló anteriormente).

Cebadores: (véanse las Tablas 6 y 7 a continuación)

ES 2 425 749 T3

Tabla 6: cebadores externos de PCR:

Exón	Secuencia del cebador hacia adelante, (5'→3')	SEQ ID NOS	Secuencia inversa del cebador, (5'→3')	SEQ ID NOS
18	TCAGAGCCTGTGTTTCTACCAA	653	TGGTCTCACAGGACCACTGATT	646
19	AAATAATCAGTGTGATTCGTGGAG	654	GAGGCCAGTGCTGTCTCTAAGG	647
20	ACTTCACAGCCCTGCGTAAAC	655	ATGGGACAGGCACTGATTTGT	648
21	GCAGCGGGTTACATCTTCTTTC	656	CAGCTCTGGCTCACACTACCAG	649
22	CCTGAACTCCGTCAGACTGAAA	657	GCAGCTGGACTCGATTTCT	650
23	CCTTACAGCAATCCTGTGAAACA	658	TGCCCAATGAGTCAAGAAGTGT	651
24	ATGTACAGTGCTGGCATGGTCT	659	CACTCACGGATGCTGCTTAGTT	652

TABLA 7: Cebadores internos de PCR:

Exón	Secuencia del cebador hacia adelante, (5'→3')	Secuencia inversa del cebador, (5'→3')	Longitud del producto (pb)
18	TCCAAATGAGCTGGCAAGTG (SEQ ID NO 660)	TCCCAAACACTCAGTGAAACAAA (SEQ ID NO 667)	397
19	GTGCATCGCTGGTAACATCC (SEQ ID NO 661)	TGTGGAGATGAGCAGGGTCT (SEQ ID NO 668)	297
20	ATCGCATTGATGCGTCTTCA (SEQ ID NO 662)	ATCCCCATGGCAAACCTCTTG (SEQ ID NO 669)	378
21	GCTCAGAGCCTGGCATGAA (SEQ ID NO 663)	CATCCTCCCCTGCATGTGT (SEQ ID NO 670)	348
22	TGGCTCGTCTGTGTGTGTCA (SEQ ID NO 664)	CGAAAGAAAATACTTGCATGTCAGA (SEQ ID NO 671)	287
23	TGAAGCAAATTGCCAAGAC (SEQ ID NO 665)	TGACATTTCTCCAGGGATGC (SEQ ID NO 672)	383
24	AAGTGTGCGCATCACCAATGC (SEQ ID NO 666)	ATGCGATCTGGGACACAGG (SEQ ID NO 673)	302
Enlazador del cebador F	tgtaaacgacggccagt (SEQ ID NO 646)	Extremo 5' de todos los cebadores hacia adelante	18
Enlazador del cebador R	aacagctatgaccatg (SEQ ID NO 674)	Extremo 5' de todos los cebadores inversos	16

Precauciones

Tabla 8

Tarea	Instrucción(es)	Riesgo
1.	Montaje de la PCR Uso de campana para PCR Uso dedicado de pipetas y puntas filtradas Únicamente abrir reactivos en la campana	Contaminación de la reacción de la PCR
2.	Uso de campana para PCR	No utilizar ninguna muestra o reactivo después de la PCR en la campana Contaminación de la reacción de la PCR

Preparar de la mezcla de reacción PCR para PCR externo

- 5 Todos los procedimientos se realizan en una campana para PCR para ADN genómico, no la campana limpia.
1. Descongelar la Taq Gold y dNTP sobre hielo.
 2. Preparar la mezcla maestra en un tubo (tubos Eppendorf o de 15 mL) usando la tabla presentada más abajo. Deben añadirse agua, betaina, amortiguador 10X, MgCl₂, DMSO, Taq Gold y dNTP en el orden indicado. Es muy importante mezclar los reactivos pipeteando hacia arriba y hacia abajo suavemente mientras que añade cada reactivo.
- 10
3. El ADN se debe añadir a la mezcla maestra antes de formar las alícuotas. Después de elaborar un gran volumen de mezcla maestra, se toma una alícuota de 96 ul (suficiente para 8 rxns) a un tubo separado para cada paciente o control. Se añaden 8 ul de ADN a razón de 5 ng / ul a los 96 ul de la mezcla maestra. Se puede añadir luego 13 ul a los pozos individuales de la placa o colocarlos en tubos de tiras y pipetearlos con una pipeta multicanal.
- 15
4. Para una placa de 384 pozos llena de reactivos, se elabora mezcla maestra suficiente para aproximadamente 415 reacciones.
 5. Girar la placa de la mezcla maestra para deshacerse de las burbujas de aire.
 6. Si se utiliza un grupo grande de cebadores, ayudaría a tenerlos en placas de 96 pozos con cebadores hacia adelante y cebadores inversos en placas separadas.
- 20
7. Añadir los cebadores utilizando una pipeta multicanal. Asegurarse de mezclar pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo.
 8. Girar la placa para eliminar cualquier burbuja de aire.
 9. Utilizar el ciclo siguiente para amplificación.

Nota: la PCR se realiza en placas de 384 pozos.

25

Tabla 9

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
ddH ₂ O autoclavada	4,90
Betaina 5M	3,00
Amortiguador 10X	1,50

(continuación)

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
Cloruro de magnesio	1,50
DMSO	0,75
Taq	0,20
dNTP	0,15
Cebador 1 hacia adelante para la PCR (conc. 20 pmol/uL)	1,00
Cebador 2 inverso para la PCR (conc. 20 pmol/uL)	1,00
ADN (conc. 5 ng/uL)	1,00
Volumen total de reacción PCR	15,00

Tabla 10: Ciclo de amplificación de la PCR

Activación de Taq Gold	10 minutos	95° C	30 ciclos
Desnaturalización	30 segundos	95° C	
Hibridación	30 segundos	60° C	
	1 minuto	72° C	
Extensión	10 minutos	72° C	
Sostenimiento	∞	4° C	
Nota: No es necesaria una limpieza después de realizar la PCR externa.			

5 Preparación de la mezcla de reacción PCR para PCR interna

El montaje de la PCR interna es casi el mismo que el de la PCR externa con unas pocas excepciones.

1. Elaborar el gran volumen de mezcla maestra como se describe para la PCR externa en la campana de PCR.
2. Alícuota MM para tubos de 7 tiras y pipeta multicanal de 12 ul en la placa de 384 pozos.
3. Añadir 1 ul de cada uno de los cebadores internos hacia delante e inversos. Sellar temporalmente la placa.

10 4. Remover de la campana, desacelerar la placa y proceder a la zona de montaje posterior de la PCR.

5. Utilizar pipetas dedicadas para alícuotas de 1 ul de producto PCR externo en cada reacción.
6. Sellar con calor y girar nuevamente.
7. Correr el mismo ciclo de amplificación como en el caso externo.

15 Correr los productos PCR sobre un gel al 1% antes de la limpieza. Determinar los exones que pasan / fallan para repetir la PCR.

ES 2 425 749 T3

Limpieza de la PCR interna utilizando perlas magnéticas Ampure

Limpieza

1. Someter a agitación tipo vórtice la placa de perlas magnéticas Ampure hasta que no haya depósito de perlas.
2. Es muy importante que la temperatura de las perlas Ampure esté a temperatura ambiente.
- 5 3. Uso del protocolo Ampure de 384 pozos en el Biomek y cambio del volumen de reacción hasta 12uL para acomodar los reactivos utilizados para la limpieza. Si esto no se hace, se puede generar un error.
4. Después de que se completa el programa, se hidrata la placa 20 uL de ddH₂O autoclavada por pozo. Mientras se añade el agua, asegúrese de mezclar pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo.
5. Girar la placa para eliminar cualquier burbuja de aire.
- 10 6. Colocar la placa en un imán para separar las perlas. Ahora se puede tomar 1 uL del ADN para configurar las reacciones de secuenciación. Guardar el resto a -20° C para un uso posterior.

Protocolo de secuenciación

Preparación de la mezcla de reacción para secuenciación

1. Descongelar BigDye 3.1 en un lugar oscuro, sobre hielo.
- 15 2. Preparar la mezcla maestra en un tubo (tubos Eppendorf o de 15 ml) utilizando la tabla que se muestra más abajo. Se deben añadir agua, amortiguador, DMSO y BigDye en el orden indicado.
3. Es muy importante mezclar los reactivos pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo mientras se añade cada reactivo.
4. Cuando se utiliza un cebador universal para secuenciación, también se puede añadir el cebador a la mezcla maestra en este momento. Si el cebador es único se debe añadir en forma individual después de que la mezcla maestra está en la placa de 384 pozos.
- 20 5. Usualmente, para una placa completa de 384 pozos de reacciones, elaborar suficiente mezcla maestra para aproximadamente 415 reacciones.
6. Una vez que se configura la mezcla maestra, se divide la mezcla en 8 pozos de tubos de tiras. (No utilizar depósitos para tomar alícuotas de la mezcla maestra. Eso sería un desperdicio de reactivos)
- 25 7. Ahora se puede utilizar una pipeta multicanal para tomar alícuotas de la mezcla maestra en la placa de 384 pozos.
8. Girar la placa de la mezcla maestra para deshacerse de las burbujas de aire.
9. Añadir el producto PCR para ser secuenciado utilizando una pipeta multicanal. Asegurarse de mezclar pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- 30 10. Girar la placa para eliminar cualquier burbuja de aire.
11. Utilizar el ciclo que se presenta a continuación para la amplificación.

Tabla 11

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
ddH ₂ O autoclavada	4,38
Amortiguador ABI 5X	3,65

(continuación)

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
DMSO	0,50
BigDye 3.1 ABI	0,35
Concentración del cebador de secuenciación	0,12
ADN de la reacción PCR interna	1,00
Volumen total de la reacción	10,00

Tabla 12: Ciclo de amplificación para secuenciación

Desnaturalización	10 segundos	96°C	25 ciclos
Hibridación	5 segundos	50°C	
Extensión	4 minutos	60°C	
Sostenimiento	∞	4°C	

- 5 Limpieza a través de las perlas magnéticas Cleanseq
- Someter a agitación tipo vórtice la placa de perlas magnéticas CleanSeq hasta que no haya depósito de perlas.
 - Utilizar el programa para placas de 384 pozos en el Biomek para limpiar las muestras.
 - Una vez corrido el programa, guardar la placa original a -20° C. La nueva placa con las muestras limpias está lista para ir al ABI 3730.
- 10 (Nota: Si los productos PCR son más cortos que 300 pb se debe diluir la muestra antes de colocarla en el ABI 3730)
- Crear moldes Mutation Surveyor para la prueba del EGFR y guardarlos en LMM/secuenciación/secuencias - MS Review / EGFR.
- Repetición de los criterios de los resultados
- 15 Todos los resultados positivos se repiten por medio de la amplificación y secuenciación del (de los) exón(es) específico(s) en la cual se haya detectado un cambio en la secuencia de ADN de una segunda alícuota del ADN del paciente derivado de la muestra de tejido original. Además, el ADN extraído de una muestra de la sangre del paciente se debe correr en forma paralela para comparar con el tejido del tumor si el cambio detectado de la secuencia no ha sido previamente detectado en un paciente que responde al gefitinib o al erlotinib.
- 20 Cualquier exón que no produjera una secuencia clara se repetirá ya sea a partir de la extracción, la PCR o la secuenciación, con base en los problemas técnicos específicos.
- Parámetros del ensayo
- 25 Sensibilidad del ensayo: se han encontrado mutaciones somáticas del dominio quinasa de *EGFR* aproximadamente en 13% de los individuos con NSCLC (Paez J. G. et al., 2004). Además, se han encontrado mutaciones somáticas en el dominio quinasa del *EGFR* en 13/14 individuos (92,8%) con NSCLC que fueron sensibles al gefitinib (Paez JG et al., 2004, Lynch, et al., 2004). La validación de la sensibilidad técnica del ensayo demostró 100% de sensibilidad a las mutaciones conocidas y la validación de la plataforma de secuenciación en nuestro laboratorio muestra una sensibilidad del 100% (véase "precisión de la técnica" más abajo). Se determinó que la sensibilidad para la detección

de la mutación de muestras mosaico es del 25% (es decir, se pueden detectar mutaciones heterocigotos cuando están presentes en un 50% de una mezcla de células). Se ha encontrado que hasta un 20% del tejido embebido en parafina no produce un ADN de alta calidad. No se puede obtener información de la secuencia a partir de estas muestras.

- 5 Especificidad del ensayo: hasta la fecha, la literatura publicada indica que ningún individuo con una mutación somática en EGFR fuera sensibles al gefitinib (11/11). La posibilidad de encontrar una mutación debido a un artefacto de secuenciación bidireccional es cercana al 0% (véase "precisión de la técnica" a continuación). Como tal, la especificidad del ensayo es aproximadamente del 100%.

- 10 Precisión de la técnica: la técnica de secuenciación de ADN es el estándar dorado en los diagnósticos moleculares. Este laboratorio utiliza el analizador de ADN ABI 3730 que ha reportado una precisión del 98,5%. Combinando esto con una secuenciación bidireccional, el análisis automatizado de un cromatograma con Mutation Surveyor, y el análisis manual de los falsos positivos, se ha logrado una tasa de precisión del 100%. Esto con base en el análisis de más de 100.000 bases de secuencias sin procesar. Para más información sobre esta evaluación, consulte nuestro manual de Programa de Aseguramiento de Calidad.

- 15 Nota: no se asume que estos resultados garantizan el 100% de precisión de esta plataforma. Se sabe que pueden presentarse errores en la secuenciación y por lo tanto, se reporta una precisión que es del 99,99% que ha sido encontrada por proyectos de secuenciación a gran escala (Hill et al., 2000).

- 20 Reproducibilidad del ensayo: debido a la precisión del ensayo, cuando se obtienen los resultados, tienen una reproducibilidad igual a la precisión del ensayo (99,99%). Sin embargo, a veces, el ensayo puede fallar debido a factores como los enumerados más adelante (véase Limitaciones del método) o debido a fallas en la secuenciación o de la PCR debido a razones técnicas sin explicación. En estos casos, no se obtienen resultados y se repite el ensayo hasta obtener un resultado o el espécimen del paciente se considera inaceptable. Las tasas específicas de fracaso de cada etapa del ensayo y de los especímenes pueden encontrarse en nuestro manual de Programa de Aseguramiento de Calidad.

- 25 Rango normal de los resultados: la secuencia normal del gen *EGFR* se puede encontrar en línea utilizando los números de acceso del GenBank: Nt_033968.5 (secuencia genómica) y NM_005228.3 (secuencia de ARNm).

Limitaciones del Método:

- 30 Grandes supresiones que abarcan uno o más exones no serán detectadas por el método de secuenciamiento, particularmente si están presentes en mutaciones de heterocigotos en el gen *EGFR* fuera del dominio quinasa, no serán detectados por el ensayo. Pueden estar presentes inhibidores en la muestra de ADN impidiendo la amplificación por PCR. El ADN degradado puede no producir datos analizables y puede requerirse reenviar espécimen. Las variaciones raras de la secuencia o estructuras secundarias de las secuencias del cebador objetivo podrían afectar la amplificación por PCR y por lo tanto la(s) mutación(es) podría(n) perderse en aquella región de un alelo.

35 Ejemplo 6

- 40 El gefitinib (Iressa) es un inhibidor de la tirosina quinasa que dirige al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), e induce respuestas clínicas dramáticas en los cánceres de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con mutaciones de activación dentro del dominio quinasa del EGFR. Reportamos que estos EGFR mutantes activan selectivamente las rutas de señalización Akt y STAT, que promueven la supervivencia celular, pero no tienen ningún efecto sobre la señalización de Erk / MAPK, que induce la proliferación. Los NSCLC que expresan los EGFR mutantes sufrieron una amplia apoptosis después de la desactivación mediada por ARNpi del EGFR mutante o el tratamiento con inhibidores farmacológicos de la señalización de Akt y STAT, y eran relativamente resistentes a la apoptosis inducida por fármacos quimioterapéuticos convencionales. Por lo tanto, los EGFR mutantes transducen selectivamente las señales de supervivencia de las cuales se vuelven dependientes los NSCLC; en consecuencia, la inhibición de esas señales por gefitinib puede ser la verdadera razón de respuestas clínicas notables.

- 50 Las tirosina quinasas receptoras de la familia del EGFR regulan funciones celulares esenciales incluyendo la proliferación, supervivencia, migración, y diferenciación, y parecen jugar un papel central en la etiología y progreso de los tumores sólidos (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003), H. S Earp, T. L. Dawson, X. Li, H. Yu, Breast Cancer Res. Treat. 35, 115 (1995)). El EGFR se sobreexpresa frecuentemente en cáncer de mama, de pulmón, de colon, y en tumores cerebrales, lo que provocó el desarrollo de inhibidores farmacológicos específicos, tales como gefitinib, que afectan la actividad de quinasa del EGFR mediante el enlazamiento del bolsillo de ATP en el dominio catalítico (A- E. Wakeling et al., Cancer Res. 62, 5749 (2002)). Gefitinib ha inducido respuestas clínicas dramáticas en aproximadamente el 10% de los pacientes con NSCLC refractario a la quimioterapia (J. Baselga et al., J. Clin. Oncol. 20, 4292 (2002), M. Fukuoka et al., J. Clin. Oncol. 21, 2237 (2003), G.

- 5 Giaccone et al., J Clin Oncol. 22, 777 (2004), M. G. Kris et al., JAMA 290, 2149 (2003)). Prácticamente todos los cánceres de pulmón sensibles a gefitinib albergan mutaciones somáticas en el dominio quinasa del EGFR, mientras que no se han observado mutaciones en los casos no sensibles (T. J. Lynch et al., N. Engl. J. Med. 350, 2129 (2004), J. G. Paez et al., Science 304, 1497 (2004)). Estas mutaciones heterocigotas incluyen supresiones pequeñas en el marco y sustituciones en sentido erróneo agrupadas dentro del bolsillo de enlazamiento del ATP.
- Utilizando transfecciones transitorias de los EGFR mutantes, se mostró previamente que ambos tipos de mutaciones conducen a una mayor activación del receptor de depende de EGF, tal como se mide por la autofosforilación de Y1068, uno de los sitios de fosforilación prominentes del terminal C del EGFR. (T. J. Lynch et al., N. Engl. J. Med. 350, 2129 (2004)).
- 10 Para permitir los estudios de diferencias cualitativas en la señalización por los EGFR mutantes, hemos generado líneas estables de células epiteliales mamarias de ratón no transformadas (NMuMg) que expresan EGFR de tipo silvestre o mutante, y se analizó la autofosforilación mediada por EGF de múltiples residuos de tirosina vinculados a la activación de distintos efectores secuencia abajo (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003)). Se generaron líneas celulares que expresan, ya sea EGFR de tipo silvestre o una de las dos mutaciones recurrentes detectadas en los tumores de los pacientes que responden a gefitinib: la mutación en sentido erróneo L858R y la supresión en el marco de 18 pb, delL747-P753insS. No se observaron patrones de fosforilación de tirosina significativamente diferentes entre los EGFR de tipo silvestre y los dos mutantes en diferentes sitios del terminal C. La fosforilación inducida por EGF de Y1045 y Y1173 era virtualmente indistinguible entre los EGFR de tipo silvestre y mutante, mientras que la fosforilación de Y992 y Y1068 se incrementó sustancialmente en ambos mutantes.
- 15 Curiosamente, Y845 fue altamente fosforilado en el mutante de sentido erróneo L858R, pero no en el de tipo silvestre o el mutante de supresión, y por lo tanto parece ser único para distinguir entre los dos tipos de mutaciones de EGFR. El patrón de fosforilación de la tirosina inducida por EGF diferencial observado con los receptores de tipo silvestre y mutante fue reproducible en células COS7 transfectadas transitoriamente, asegurando contra efectos potenciales específicos del tipo de célula.
- 20 Por lo tanto, los EGFR mutantes sensibles gefitinib transducen señales que son cualitativamente distintas de aquellas mediadas por EGFR de tipo silvestre. Estas diferencias pueden resultar directamente de las alteraciones estructurales en el bolsillo catalítico afectando la especificidad del sustrato, o de las interacciones alteradas con las proteínas accesorias que modulan la señalización del EGFR.
- El establecimiento de líneas celulares transfectadas establemente con los EGFR mutantes hizo posible comparar el estado de fosforilación de los principales objetivos secuencia abajo del EGFR en un fondo celular compartido. La activación inducida por EGF de Erk1 y Erk2, a través de Ras, Akt a través de PLC γ /PI3K y de STAT3 y STAT5 a través de JAK2, son rutas esenciales secuencia abajo que median los efectos oncogénicos del EGFR (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003)). La activación de Erk inducida por EGF era esencialmente indistinguible entre las células que expresan EGFR de tipo silvestre o cualquiera de los dos que activan mutantes de EGFR. Por el contrario, la fosforilación de Akt y STAT5 se elevó sustancialmente en las células que expresan cualquiera de los EGFR mutantes. El aumento de la fosforilación de STAT3 se observó también en forma similar en células que expresan EGFR mutantes. La activación de Erk inalterada por los EGFR mutantes es coherente con la ausencia de aumento de la fosforilación de Y1173, un importante sitio de acoplamiento para los adaptadores Shc y grb-2 que conduce a la activación de Ras y la posterior fosforilación de Erk (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003)). El aumento de fosforilación de Akt y STAT después de la activación de los EGFR mutantes es consistente con el aumento en fosforilación de Y992 y Y1068, ambos de los cuales han sido previamente vinculados a la activación de Akt y STAT (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003)). Por lo tanto, la autofosforilación selectiva inducida por EGF del los residuos de tirosina del terminal C dentro de los mutantes de EGFR está bien correlacionada con la activación selectiva de las rutas de señalización secuencia abajo.
- 30 Para extender estas observaciones a las células de cáncer de pulmón en las cuales las mutaciones de *EGFR* parecen dirigir la tumorigénesis, hemos estudiado las líneas derivadas de cinco tumores de NSCL. NCI-H1975 transporta la mutación de sentido erróneo heterocigota recurrente L858R y NCI-H1650 tiene la supresión en el marco delE746-A750, mientras que el NCI-358, NCI-H1666 y NCI-H1734 expresan *EGFR* de tipo silvestre. Al igual que en las células transfectadas, la autofosforilación inducida por EGF de Y992 y Y1068 se elevó marcadamente en las dos líneas con mutaciones de *EGFR* endógeno, al igual que la fosforilación de Akt y STAT5, pero no Erk.
- 35 La actividad oncogénica de EGFR refleja la activación de señales que promueven tanto la proliferación celular y como la supervivencia celular (S. Grant, L. Qiao, P. Dent, Front. Biosci. 7, d376 (2002)). Mientras que estas rutas exhiben solapamiento, la activación mediada por Ras de las quinastas Erk contribuye sustancialmente a la actividad proliferativa de EGFR, mientras que la activación de Akt y STAT está vinculada en gran medida a una función anti-apoptótica (S. Grant, L. Qiao, P. Dent, Front. Biosci. 7, d376 (2002), F. Chang et al., Leukemia 17, 1263 (2003), F. Chang et al., Leukemia 17, 590 (2003), F. Chang et al., Int. J. Oncol. 22, 469 (2003), V. Calo et al., J. Cell Physiol. 197, 157 (2003), T. J. Ahonen et al., J. Biol. Chem. 278, 27287 (2003)). Las dos líneas celulares de cáncer de pulmón que albergan mutaciones de *EGFR* mostraron una respuesta proliferativa a EGF a bajas concentraciones de

suero que no se observó en las células con receptores de tipo silvestre. Sin embargo, su tasa de proliferación y la densidad de las células en confluencia fueron comparables a las concentraciones séricas normales.

ARNpi

5 En contraste, las rutas apoptóticas eran marcadamente diferentes en las células de cáncer de pulmón con EGFR
mutantes: la inactivación específica mediada por ARNpi de *EGFR* mutante en estas líneas celulares resultó en una
rápida y masiva apoptosis. Alrededor del 90% de las células NCI-H1975 transfectadas con ARNpi específico de
L858R murieron en un lapso de 96 horas, como lo hicieron las células NCI-H1650 transfectadas con ARNpi
10 específico de delE746-A750. El ARNpi específico, para cualquier mutación de *EGFR* no tuvo ningún efecto sobre las
células que expresan la mutación alternativa, y ARNpi que dirige tanto a *EGFR* de tipo silvestre como mutante tuvo
un efecto mínimo sobre la viabilidad de las células que expresan sólo los receptores de tipo silvestre, pero indujo
una rápida muerte celular en líneas que expresan mutantes de *EGFR*. La capacidad de los ARNpi para dirigir
específicamente a los alelos correspondientes de *EGFR* fue confirmada en las células transfectadas COS7 por
15 medio de inmunotransferencia. Por lo tanto, parece esencial la expresión de los EGFR mutantes para la supresión
de las señales pro-apoptóticas en los cánceres de pulmón que albergan estas mutaciones. El hecho de que las
células de cáncer de pulmón que expresan sólo los receptores de tipo silvestre no muestran una dependencia similar
sobre la expresión de EGFR también puede dar cuenta de la relativa insensibilidad al gefitinib de tumores humanos
que sobreexpresan EGFR de tipo silvestre.

20 La efectividad de gefitinib en cánceres de pulmón que albergan EGFR mutantes puede reflejar tanto su inhibición de
las rutas anti-apoptóticas críticas sobre las cuales estas células se han vuelto estrictamente dependientes, así como
las propiedades bioquímicas alteradas de los receptores mutantes. Hemos informado anteriormente que los EGFR
mutantes son más sensibles a la inhibición de gefitinib de autofosforilación dependiente de EGF que los receptores
de tipo silvestre (T. J. Lynch et al., N. Engl. J. Med. 350, 2129 (2004)). También se observó este aumento de
25 sensibilidad al fármaco por parte de los receptores mutantes, tanto para la activación de Erk como de STAT5. Por lo
tanto, mientras que la señalización inducida por EGF por parte de los receptores mutantes demuestra activación
selectiva de los efectores secuencia abajo a través de eventos de autofosforilación diferenciales, su mayor inhibición
por gefitinib es uniforme, y puede reflejar enlazamiento alterado del fármaco con el bolsillo del ATP mutante.

30 Para establecer la relevancia del aumento de señalización de Akt y STAT en superviviente del NSCL mediado por
EGFR, nos centramos en estas rutas con inhibidores farmacológicos específicos. Las células de cáncer de pulmón
que albergan mutaciones de *EGFR* eran 100 veces más sensibles al gefitinib que las células con receptores de tipo
silvestre. Las células que expresan EGFR mutantes también eran más sensibles a la inhibición farmacológica de la
señalización de Akt o STAT que las células que expresan sólo EGFR de tipo silvestre. Mientras que las células de
cáncer de pulmón mutantes de EGFR mostraron aumento de la sensibilidad a la interrupción de las señales anti-
apoptóticas mediadas por Akt / STAT, demostraron notable aumento de la resistencia a las señales de muerte
35 celular inducidas por los agentes quimioterapéuticos comúnmente utilizado doxorubicina y cisplatino, y el ligando de
FAS pro-apoptótico.

La señalización mejorada de Akt / STAT en las células con EGFR mutante puede proporcionar por lo tanto, un
objetivo terapéutico adicional, mientras aumenta la posibilidad de que la quimioterapia convencional pueda ser
menos efectiva contra estos tumores.

40 Se ha propuesto "adicción oncogénica" para explicar la apoptosis de las células cancerosas después de la supresión
de una señal proliferativa de la cual se han vuelto dependientes (I. B. Weinstein, Science 297, 63 (2002)).
Curiosamente, imatinib (Gleevec) activa eficientemente la muerte celular en leucemias mieloides crónicas que
expresan el producto de la translocación BCR-ABL y en los tumores del estroma gastrointestinal que expresan la
activación de mutaciones de c-Kit, los cuales exhiben frecuentemente activación constitutiva de STAT que es
45 inhibida eficazmente por el fármaco (T. Kindler et al., leukemia 17, 999 (2003), G. P. Paner et al., Anticancer Res.
23, 2253 (2003)). Del mismo modo, en las células de cáncer de pulmón con mutaciones de la quinasa de EGFR, la
sensibilidad al gefitinib puede resultar en gran parte de su inhibición efectiva de señales anti-apoptóticas esenciales
transducidas por el receptor mutante.

Materiales y métodos

Inmunotransferencia

50 Los lisados de células cultivadas se prepararon en solución de lisis RIPA enfriada con hielo (Triton X-100 al 1%,
SDS al 0,1%, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, β-glicerol-fosfato 10 mM, NaF 10
mM, ortovanadato de sodio 1 mM, que contienen inhibidores de proteasa. Se removieron los residuos por
centrifugación en una microcentrífuga a 12.000 xg durante 10 min a 4° C. Se calentaron a ebullición los lisados
clarificados en gel que carga amortiguador y se separaron por medio de SDS-PAGE al 10%. Se electrotransfirieron
55 las proteínas a nitrocelulosa y se detectaron con anticuerpos específicos, seguido por incubación con anticuerpo de

5 cabra secundario conjugado con peroxidasa de rábano (señalización celular (Beverly, MA; 1: 2000) y desarrollo con quimioluminiscencia mejorada (DuPont NEN), seguido por autorradiografía). Se obtuvieron los anticuerpos fosfo-EGFR Y845, Y992, Y1045, Y1068, fosfo-STAT5 (tyr694), fosfo-Akt (Ser473), fosfo-Erk1 / 2 (Thr202/Tyr204), Akt, STAT5 y ERK1 / 2 a través de New England Biolabs (Beverly, MA). Se obtuvo anticuerpo Ab-20 de EGFR total a través de NeoMarkers (Fremont, CA). El anticuerpo Y1173 de fosfo-EGFR a través de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) y el anticuerpo total de fosfotirosina PY-20 a través de Transduction Laboratories (Lexington, KY). Todos los anticuerpos se utilizaron en una dilución de 1:1000.

Vectores de expresión de EGFR

10 Los constructos de expresión de longitud completa de EGFR que codifican las mutaciones L858 o delL747-P753insS de tipo silvestre fueron sub-clonados utilizando métodos estándar en el plásmido pUSEamp. Se confirmaron todos los constructos por medio de análisis de secuencia de ADN.

Líneas celulares y transfecciones

15 Se cultivaron células COS7 y células NMuMg (epiteliales mamarias de ratón normales) en DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) con suero de ternera fetal al 10% en presencia de L-glutamina 2mM y 50 U / ml de penicilina / estreptomina. Se obtuvieron las líneas celulares de cáncer de pulmón humano NCI-H358, NCI-H1650, NCI-H1734, NCI-H1666 y NCI-H1975 a través de la colección American Type Culture Collection y se cultivaron en RPMI1640 con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 50 U / ml de penicilina / estreptomina y piruvato de sodio 1mM. Se denominan en el texto, en forma abreviada, como H358, H1650, H1734, H1666 y H1975, respectivamente. La transfección transitoria de células COS7 se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se transfectó el plásmido (1 µg) en células con un 80% de confluencia en una placa de 10 cm. Después de 12 horas, se recogieron las células y se volvieron a sembrar en placas de 12 pozos en ausencia de suero. Al día siguiente, se estimularon las células con 30 ng/ml de EGF. Se prepararon las líneas celulares estables NMuMg mediante cotransfección de los constructos de expresión de EGFR con el plásmido seleccionable por el fármaco pBABE puro, seguido por selección en 3 ug / ml de puomicina. Se utilizaron reservorios de células resistentes al fármaco para el análisis. La expresión de EGFR en las células transfectadas de forma estable se confirmó mediante inmunotransferencia.

“Desactivación” mediada por ARNpi de la expresión de EGFR

30 Se diseñó ARNpi para L858R de EGFR para dirigir la secuencia de nucleótidos CACAGATTTTGGCGGGCCAA (SEQ ID NO. 688), mientras que se utilizó la secuencia GCTATCAAAACATCTCCGAAA (SEQ ID NO: 689) para la delE745-A750 (Qiagen, Valencia, CA). Para dirigir todas las formas de EGFR, se obtuvo ARNpi preparado comercialmente correspondiente a EGFR de tipo silvestre humano a través de Dharmacon (Lafayette, CO). Se llevó a cabo la transfección de los ARNpi con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las células se ensayaron para determinar la viabilidad después de 96 horas usando el ensayo de MTT.

Ensayo de apoptosis

35 Se sembraron 10.000 células en pozos individuales de una placa de 96 pozos. Después de 6 horas, se cambió el medio y se mantuvieron las células en presencia de concentraciones crecientes de doxorubicina (Sigma, St. Louis, MO), cisplatino (Sigma), ligando Fas (activador humano, clon CH11; Upstate Biotechnology), Ly294002 (Sigma), o AG490 (Calbiochem, La Jolla, CA). Después de 96 horas, se determinó la viabilidad de las células utilizando el ensayo de MTT. Para la inmunocoloración de la caspasa, se sembraron 10.000 células sobre cubreobjetos de 10 mm. Al día siguiente fueron transfectadas con ARNpi (véase la sección anterior para más detalles). Después de 72 horas, se fijaron las células en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se permeabilizaron durante 5 min en Triton X-100 al 0,5% y se bloquearon durante 1 h en suero normal de cabra al 5% (NGS). Se incubaron los cubreobjetos durante la noche a 4° C en anticuerpo primario (caspasa-3 Asp 175 5A1 escindida a través de Cell Signaling) con una dilución de 1:100. Al día siguiente, se lavaron los cubreobjetos 3 veces en PBS y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario (conjugado de Texas-red anti-conejo de cabra; de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) con una dilución 1:250 en suero de cabra normal al 5% y 0,5 µg / ml de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Después de 3 lavadas en PBS, se montaron los cubreobjetos con reactivo contra la decoloración ProLong Gold de Molecular Probes (Eugene, OR).

Ensayo de viabilidad celular

50 Se añadieron 10 µl de solución de 5 mg/ml de MTT (azul de tiazolilo; Sigma) a cada pozo de una placa de 96 pozos. Después de 2 horas de incubación a 37° C, se removió el medio y se solubilizó la MTT mediante la adición de 100 µl de isopropanol ácido (HCl 0,1 normal) a cada pozo. Se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a 570 nm.

Curva de crecimiento

5 Se obtuvieron curvas de crecimiento para las células H-358, H-1650, H-1734, y H-1975 sembrando 1.000 células en pozos individuales de placas de 96 pozos. Se sembró en placa cada línea celular en 8 pozos separados. Los siguientes días, se fijaron las células en formaldehído al 4% y se tiñeron con solución de cristal violeta al 0,1% (p / v). Se solubilizó luego el cristal violeta 100 µl de ácido acético al 10%, y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas para determinar el número relativo de células.

Identificación de la mutación

10 Para identificar líneas de células esporádicas de NSCLC que albergan mutaciones dentro del EGFR, se secuenciaron los exones 19 y 21 dentro de un panel de 15 líneas celulares de NSCLC, como se describió anteriormente. Se seleccionaron líneas celulares para análisis con base en su derivación a partir de tumores de histología broncoalveolar, independientemente de los antecedentes de tabaquismo (NCI-H358, NCI-H650, NCI-H1650), o de adenocarcinomas que surgen dentro de los no fumadores (NCI-H1435, NCI-H1563, NCI-H1651, NCI-H1734, NCI-H1793, NCI-H1975, NCI-H2291, NCI-H2342, NCI-H2030, NCI-H1838, NCI-H2347, NCI-H2023). Se ha reportado que NCI-H1666 albergar únicamente EGFR de tipo silvestre (véanse los ejemplos anteriores). Todas las líneas celulares están disponibles a través de la American Type Culture Collection.

15

Tabla 1. Características de 9 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y sensibilidad al gefitinib

Paciente No.	Sexo	Edad al inicio de la terapia de gefitinib años	Tipo patológico*	No. de regímenes anteriores	Estatus de fumador [†]	Duración de la terapia meses	Supervivencia total [‡]	Mutación del EGFR [§]	Respuesta [¶]
1	F	70	BAC	3	Nunca	15,6	18,8	Sí	Mayor; lesiones pulmonares mejoradas
2	M	66	BAC	0	Nunca	>14,0	>14,0	Sí	Mayor; lesiones pulmonares bilaterales mejoradas
3	M	64	Adeno	2	Nunca	,6	12,9	Sí	Parcial; lesiones pulmonares mejoradas
4	F	81	Adeno	1	Ex-fumador	>13,3	>21,4	Sí	Menor; enfermedad pleural mejorada
5	F	45	Adeno	2	Nunca	>14,7	>14,7	Sí	Parcial; lesiones hepáticas mejoradas
6	M	32	BAC	3	Nunca	>7,8	>7,8	Sí	Mayor; lesiones pulmonares mejoradas
7	F	62	Adeno	1	Ex-fumador	>4,3	>4,3	Sí	Parcial; lesiones pulmonares y hepáticas mejoradas
8	F	58	Adeno	1	Ex-fumador	11,7	17,9	Sí	Parcial; lesiones hepáticas mejoradas
9	F	42	BAC	2	Nunca	>33,5	>33,5	No	Parcial; nódulos pulmonares mejorados

* Adenocarcinoma (Adeno) con cualquier elemento del carcinoma broncoalveolar (BAC) se enumera como BAC

[†] El estatus de fumador se definió como de ex-fumador si el paciente no había fumado ningún cigarrillo en u lapso de 12 meses antes de entrar y nunca si el paciente había fumado menos de 100 cigarrillos en toda su vida.

[‡] Se midió la supervivencia total desde el comienzo del tratamiento con gefitinib hasta la muerte.

[§] EGFR denota el gen para el receptor del factor de crecimiento epidérmico

[¶] Se evaluó una respuesta parcial con el uso de criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos; se evaluaron las respuestas mayor y menor por parte de dos médicos en pacientes en quienes no se podía medir la respuesta con el uso de estos criterios.

ES 2 425 749 T3

Paciente	Mutación	Efecto de la mutación
Pacientes con sensibilidad al gefitinib		
Paciente 1	Supresión de 15 nucleótidos (2235 - 2249)	Supresión en el marco (746 - 750)
Paciente 2	Supresión de 12 nucleótidos (2240 - 2251)	Supresión en el marco (747 - 751) e inserción de un residuo de serina
Paciente 3	Supresión de 18 nucleótidos (2240 - 2257)	Supresión en el marco (747 - 753) e inserción de un residuo de serina
Paciente 4	Supresión de 18 nucleótidos (2240 - 2257)	Supresión en el marco (747 - 753) e inserción de un residuo de serina
Paciente 5	Sustitución de G por T en el nucleótidos 2573	Sustitución de aminoácido (L858R)
Paciente 6	Sustitución de G por T en el nucleótidos 2573	Sustitución de aminoácido (L858R)
Paciente 7	Sustitución de A por T en el nucleótidos 2582	Sustitución de aminoácido (L861Q)
Paciente 8	Sustitución de T por G en el nucleótidos 2155	Sustitución de aminoácido (G719C)
Pacientes sin exposición al gefitinib*		
Paciente A	Supresión de 18 nucleótidos (2240 - 2257)	Supresión en el marco (747 - 753) e inserción de un residuo de serina
Paciente B	Supresión de 15 nucleótidos (2235 - 2249)	Supresión en el marco (746 - 750)

* Entre los 25 pacientes sin exposición al gefitinib (15 con cáncer broncoalveolar, 7 con adenocarcinoma, y 3 con carcinoma de células grandes), 2 (Pacientes A y B) – quienes tenían cáncer broncoalveolar – tenían mutaciones del *EGFR*. No se encontraron mutaciones en 14 líneas celulares de cáncer de pulmón que representan tipos histológicos diversos: cáncer pulmonar de células no pequeñas (6 especímenes), cáncer pulmonar de células pequeñas (6 especímenes), carcinoma bronquial (1 espécimen), y un tipo desconocido (un espécimen). Las variantes polimórficas identificadas dentro de *EGFR* incluyen las siguientes: la sustitución de A por G en el nucleótido 1562, la sustitución de A por T en el nucleótido 1887, y una variante de línea germinal de significado funcional desconocido, la sustitución de A por G en el nucleótido 2885 dentro del dominio de tirosina quinasa.

Tabla 4: Características de la población entre 100 pacientes analizados por las mutaciones de *EGFR* como parte del cuidado del NSCLC

Características	Frecuencia
Edad promedio, años (desviación estándar)	60,7 (11,0)
Mujer	63
Raza	
Blanca	76
Asiática	7
Otra	5
Desconocida	12
Etapa al momento del ensayo	
I	15
II	4
III	10
IV	67

ES 2 425 749 T3

(continuación)

Características	Frecuencia
Desconocida	4
Histología	
BAC puro	1
Adenocarcinoma con características de BAC	24
Adenocarcinoma	69
NSCLC, todos los otros subtipos	6
Estatus de fumador	
Actual	17
Ex-fumador	48
Nunca	29
Desconocido	6
Cantidad promedio fumada por fumadores actuales y ex-fumadores, paquetes por año (desviación estándar)	39,0 (32,3)
Tiempo promedio de diagnóstico para la prueba del <i>EGFR</i> , meses (desviación estándar)	18,7 (78,4)
Tratamiento previo de quimioterapia	47
Tratamiento previo dirigido al <i>EGFR</i>	11
BAC = carcinoma broncoalveolar, <i>EGFR</i> = receptor del factor de crecimiento epidérmico	

Tabla 5: Mutaciones identificadas del gen somático para el receptor del factor de crecimiento epidérmico

Paciente	Género	Histología	Paquetes fumados por año	Exón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido
1	F	Adeno	0	18	2126A>T	E709V
				18	2155G>A	G719S
2	F	A+BAC	60	18	2156G>C	G719A
				20	2327G>A	R776H
3	F	A+BAC	0	19	2235_2249 del	K745_A750 del ins K
4	M	A+BAC	0	19	2235_2249 del	K745_A750 del ins K
5	F	Adeno	5	19	2235_2249 del	K745_A750 del ins K
6	M	Adeno	Desconocido	19	2235_2249 del	K745_A750 del ins K

ES 2 425 749 T3

(continuación)

Paciente	Género	Histología	Paquetes fumados por año	Exón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido
7	F	Adeno	0	19	2236_2250 del	E746_A750 del
8	M	Adeno	45	19	2236_2250 del	E746_A750 del
9	F	Adeno	Desconocido	19	2236_2250 del	E746_A750 del
10	M	A+BAC	12	19	2237_2255 del ins T	E746_S752 del ins V
11	M	Adeno	1	19	2239_2248 del ins C	L747_A750 del ins P
12	M	A+BAC	0	19	2239_2251 del ins C	L747_T751 del ins P
13	F	Adeno	30	19	2253_2276 del	T751_1759 del ins T
14	F	Adeno	0	19	2254_2277 del	S752_I759 del
15	F	Adeno	0	20	2303_2311 dup	D770_N771 ins SVD
16	M	Adeno	5	20	2313_2318 dup CCCCCGA	P772_H773 dup
17	F	Adeno	0	21	2543C>T	P848L*
18	M	BAC	0	21	2573T>G	L858R
19	F	A+BAC	0	21	2573T>G	L858R
20	M	A+BAC	1	21	2573T>G	L858R
21	F	Adeno	0	21	2573T>G	L858R
22	F	Adeno	15	21	2573T>G	L858R
23	F	Adeno	0	21	2582T>A	L861Q
Adeno = Adenocarcinoma, Adeno + BAC = Adenocarcinoma con características de carcinoma broncoalveolar, BAC = Carcinoma broncoalveolar puro * Esta mutación fue identificada como una variante de línea germinal						

Tabla S1A: Cebadores para amplificación de EGFR seleccionado y exones de tirosina quinasa receptora (SEQ ID NO: 1 - 212)

Gen	RefSeq	Exón	SEQ ID NO	F Anidado	R Anidado
ALK	NM_004304	24	1,2	GGAAATATAGGGAAAGGGAAAGGAA	TTGACAGGGTACCAGGAGATGA
ALK	NM_004304	25	3,4	CTGAACCCGCCAAGGACTCAT	TTTTCCCTCCCTACTAAACACAG
AXL	NM_021913	19	5,6	ACTGATGCCCTGACCCCTGTT	CCCATGGTTCGCCACTCTT
CSF1R	NM_005211	18	7,8	AGGGACTCCAAAGCCATGTG	CTCTCTGGGGCCATCCACT
CSF1R	NM_005211	19	9,10	CATTGTCAAGGCAATGTAAGTG	CTCTCACCACCCCTCGCTGT
DDR1	NM_013994	15	11,12	ACATGGGGAGCCAGAGTGAC	TGCAACCCAGAGAAAAGTGTG
DDR2	NM_006182	16	13,14	TGAGCTTTCACCCCTAGTTTGTG	GTTTGCCCTCTGCTGTCTCA
DKFZp761P1010	NM_018423	8	15,16	TGTCCCTTGTTTTTGAAGATTCC	TGCAGACAGATGACAAACATGAA
EGFR	NM_005228	2	17,18	TGGGTGAGTCTCTGTGTGGAG	CATTGCCATAGCAAAAATAAACACA
EGFR	NM_005228	3	19,20	GTTTCAACTGGGCGTCTTA	CCTTCTCCGAGGTGGAAATTG
EGFR	NM_005228	4	21,22	CGCACCATGGCATCTCTTTA	AAAAAGATCTCTATGTCCGTGGT
EGFR	NM_005228	5	23,24	CAGCCAGCCAAACAATCAGA	TCTTTGGAGTCTTCAGAGGGAAA
EGFR	NM_005228	6	25,26	TGTGGTTTCGTTGGAAAGCAA	AATTGACAGCTCCCCACAG
EGFR	NM_005228	7	27,28	GGCTTCTGACGGGAGTCAA	CCACCCAAAGACTCTCAAGA
EGFR	NM_005228	8	29,30	CCTTTCATCACCCCTCAAG	AGTGCCTTCCCATTTGCCATAA
EGFR	NM_005228	9	31,32	ACCGGAATTCCTTCTGCTT	CAGTAAACAACAACAGGGTGA
EGFR	NM_005228	10	33,34	AGGGGGTGAGTACAGGTTT	TCAGAAAGAAATGTTTTTATTCAAAGG
EGFR	NM_005228	11	35,36	GCAAAATCAATTTTCCACTT	GCAGGAGCTCTGTGCCCTAT
EGFR	NM_005228	12	37,38	TCCACAGCATGAOCTACCA	TTTGCTTCTTAAGGAACCTGAAAA
EGFR	NM_005228	13	39,40	TGTCACCCAAGGTATGGAG	CAAAAGCCAAGGGCAAGAA
EGFR	NM_005228	14	41,42	GGAGTCCCAACTCCTTGACC	GTCCTGCCACACAGGATG
EGFR	NM_005228	15	43,44	GCTTCCCCACTCACACACA	CAAACTCGCCAATTTGTTG
EGFR	NM_005228	16	45,46	CCACCAATCCAACATCCAGA	TGGCCAGAGCCATAGAAAC
EGFR	NM_005228	17	47,48	TTCCAAGATCTTACAAGATGTCA	GCACATTCAGAGATTCCTTCTGC
EGFR	NM_005228	18	49,50	TCCAAATGAGCTGGCAAGTG	TCCCAAACACTCAGTGAACAAA
EGFR	NM_005228	19	51,52	TGTCATCGCTGGTAACATCC	TGTGGAGATGAGCAGGCTCT
EGFR	NM_005228	20	53,54	ATCGCATTCATGGCTCTTCA	ATCCCATGGCAAACCTCTTG
EGFR	NM_005228	21	55,56	GCTCAGAGCCTGGCATGAA	CATCCTCCCTGCATGTTGT
EGFR	NM_005228	22	57,58	TGGCTCGTCTGTGTGTGTC	CGAAAGAAAATACTTGATGTGAGA
EGFR	NM_005228	23	59,60	TGAAGCAAATTCGCCAAGAC	TGACATTTCTCCAGGGATGC
EGFR	NM_005228	24	61,62	AAGTGTGATCAACCAATGC	ATGCGATCTGGACACAGG
EGFR	NM_005228	25	63,64	GGCACTGCTGGCAATAGAC	TGACTTCATATCCATGTTGAGTTTCACT
EGFR	NM_005228	26	65,66	TATACCCTCCATGAGGCACA	GGGAAAAACCCACACAAGAA
EGFR	NM_005228	27	67,68	TCAGAACCAAGCATCTCAAGGA	GATGCTGGAGGGAGCAACT
EGFR	NM_005228	28	69,70	CCTTGTGAGGACATTCACAGG	ATGTGCCCGAGGTGGAAAGTA
EPHA1	NM_005232	14	71,72	GGAGGGCAGAGGACTAGCTG	GTGCTGGCCAAAGTCTTTGT
EPHA1	NM_005232	15	73,74	CTGCAGCCTAGCAACAGACC	AAGAACCAGAGGAGCCAGGA
EPHA2	NM_004431	13	75,76	CGGGTAAGGATGTGGTTGT	CAGGTGTCTGCCTCTGAA
EPHA2	NM_004431	14	77,78	GCTTCAGGAGGCAGAACC	GGAGCAAGCCTAAGAAAGTTCA
EPHA3	NM_005233	10	79,80	GCCTTGTATCCATTTGCCACA	TGACAACACGTTTTGGCTCAT
EPHA3	NM_005233	11	81,82	TGCATATTCATTCAGAACAGA	AAACAGTTTCATTGCTGCTAAAT
EPHA4	NM_004438	13	83,84	CCGGATACAGATACCCAAAAGA	GGAGGCTTCAAGGGATCAGA
EPHA4	NM_004438	14	85,86	GCTGTTGCTGCTTGGCTA	TGTTTGAATGTTGAACTAGCTTGC
EPHA7	NM_004440	13	87,88	TGGCTGTCAGCTAAATAAGCATGT	TCAATTTGCTTCATTTCTCTGT
EPHA7	NM_004440	14	89,90	TGCTGCTGAACACCAACCA	TGTGTTAGTAATGTTGAAAACCTG
EPHA8	NM_020526	13	91,92	CAAAGCACCGTCTCAACTCG	CCGAAACTGCCAACTTTCAT
EPHA8	NM_020526	14	93,94	GGAAAACAGGACCCAGTGT	CCCTCCTCCACAGAGCTGAT
EPHB1	NM_004441	7	95,96	GACAGAAGCTGACAAGCAGCA	AGGTTCCATTCCTCCAGT
EPHB1	NM_004441	8	97,98	TGGGAGTGAGAGTTTGGAAAGAA	TATGAGGCCGTGAGCTGAAA
EPHB2	NM_017449	11	99,100	AGGGCCCTGCTCTGGTTT	CCAATTTGGGGTTAGTGAAA
EPHB2	NM_017449	12	101	CTCATGAGATTGGGGCATCA	AGGCCATGATCTCAGAACGC
EPHB3	NM_004443	11	103	GTTTGCAGGAGAGACGAGGT	AGGCCCTCACCCCTGTGAC
EPHB3	NM_004443	12	105	ATGACCCCTCCGATCCTACC	TAACTCTGCTCCAGGCATT

EPHB4	NM 004444	14	107	GGAAAAAGCAGAGGCAGGTG	TGGTCTCAAGAAGCCAGCAG
EPHB6	NM 004445	16	109	GACACCTCCCTCTCAT	ACTATGACACCCCGCTCAG
EPHB6	NM 004445	17	111	TGCTTGATGTAACCCCTGG	GCAATCCAACAGCCATGAGA
ERBB2	NM 004448	21	113	GGAGCAAACCCCTATGTCCA	TCCTCCAACGTGTGTGTGG
ERBB3	NM 001982	21	115	TGGGGACCACTGCTGAGAG	TGCAGCCTCTCTCCTGAA
FGFR1	NM 000604	14	117	GCAGAGCAGTGTGGCAGAAG	ACAGGTGGGAAGGGACTGG
FGFR1	NM 000604	15	119	AGTGGGGTGGGCTGAGAAC	TCTCTGGGGCAGAAAGAGGA
FGFR2	NM 000141	14	121	ACCCGGCCACACTGTATTTC	CATCCCACCCAGCTCTCAAC
FGFR2	NM 000141	15	123	AGGGCATAGCCCTATTGAGC	CCCAGGAAAAAGCCAGAGAA
FGFR3	NM 000142	13	125	CAGGTGTGGGTGGAGTAGGC	CTCAGGCGCCATCCACTT
FGFR3	NM 000142	14	127	AAGAAGACGACCAACGTGAGC	AGGAGCTCCAGGGCACAAG
FGFR4	NM 002011	14	129	CCTCCTCTGTAAAGTGGGTGGA	AGAGGGCCTCAGTGCAGAGT
FGFR4	NM 002011	15	131	AGATGGGGCAGAAC TGGATG	GGGTCCCAGACCAAATCTGA
FLT1	NM 002019	23	133	AGGTGCTCCCTTACAGCAT	TTCAGGGACTACAGCTGAGGAA
FLT1	NM 002019	24	135	GCCGTATGTTATCTGGGAGGT	TGGGCCATTACACTTTAAGA
FLT3	NM 004119	20	137	ITCCATCACCCGTACCTCCT	CCATAAATCAAAAATGCACCACA
FLT3	NM 004119	21	139	GAGTGGTCTTAGGAAGATGATGC	AAAGTCATGGGTGCAATACAA
FLT4	NM 002020	23	141	ATGGTCCCCACTGCTTGG	AGGAGCTCACTCACCCTGT
IGF1R	NM 000875	18	143	CCTTGGCTCTCCACACAT	TGGCAACGGGTAACAATGAA
INSR	NM 000208	18	145	GGCTGAGGTAAGCTGCTTCG	AAAAAGAAGTATCTGCACCIT
INSR	NM 000208	19	147	AACCCCTCTTAGGGCTCTGTG	CAGGAGGATGGCAGGCTTC
KDR	NM 002253	24	149	CGTAGAGAGCTCAGGACCTGTG	ITCCGAGAAGTTTTGCCCTGA
KIT	NM 000222	17	151	TGTGAACATCATCAAGGCCGTA	AAAATGTGTGATATCCCAGACAGG
KIT	NM 000222	18	153	TCCACATTCAGCAACAGCA	GGCTGCTTCTGAGACACAGT
LTK	NM 002344	16	155	TATCTACCGGTGCGGGACTT	AGGTGTAGCCTCCCTCACA
MERTK	NM 006343	17	157	AGGCTGGTGGTGTCTCTGTG	CAAGCTGCCAACCCCTCAGTT
MET	NM 000245	19	159	TGGATTTCAAATACTGAAGCCACT	TGGAAATGGTGGTGTGAAATTT
MUSK	NM 005592	15	161	GGGCTTCATATGTTCTGACATGG	CAGAGGACCACGCCATAAGG
MUSK	NM 005592	15	163	CCGAGATTTAGCCACCAGGA	CCTGGGAAGCAAACAACACA
NTRK1	NM 002529	15	165	AGGTCCCCAGTCTCCTCTCC	AGACCCATGCAGCCATCCTA
NTRK1	NM 002529	16	167	CGTGAACCACCGAGCTTGT	AGAGGGGCAGAAGGGGAAC
NTRK2	NM 006180	15	169	GGTGGGGGTGAGGAGCTTAG	TCGTTAAGCCACCAGTCA
NTRK2	NM 006180	16	171	TGCAATAAGGAAAGCAAACA	TCCTGACATGGTCTTCCAACC
NTRK3	NM 002530	17	173	CAGCATCTTACACACCTCTGA	GCTGGCTCTAAATCCCACT
NTRK3	NM 002530	18	175	CTAATCCGGGAAGTTGTTGC	TTCTGTATCAGCAGCTTCTCTGTG
PDGFRA	NM 006206	18	177	CAAGTGCCACCATGGATCA	GGCAGTGTACTGACCCCTGA
PDGFRA	NM 006206	19	179	GCACAAGTTATTAAGGCCCAAGG	AGCATACTGGCCTCACACCA
PDGFRB	NM 002609	18	181	GCACATGGGCAGTGTGTATT	GAGCCCCACACAGATTCTCT
PDGFRB	NM 002609	19	183	ATGGGACGGAGAAGTGGTTG	TCCCTGTATCAGGGCTCGTC
PTK7	NM 002821	18	185	TTCTACGCAGCACACCAAT	GCAGGCACTAAACCTTCTCC
PTK7	NM 002821	19	187	GCACGCATGTGACCAATTC	AGCCCTGAGAGGGAGGTAGG
RET	NM 000323	15	189	CACACACCACCCCTCTGCT	AAAGATTGGGGTGAGGCTA
RET	NM 000323	16	191	CTGAAAGCTCAGGGATAGGG	CTGGCCAAGCTGCACAGAA
ROR1	NM 005012	09	193	TGCAGCCAACGATTTGAAAG	GGAAAGCCCCAAGTCTGAAA
ROR1	NM 005012	09	195	TCATCATGAGATCCCCACT	GCATTTCCCTGAAAGGAGT
ROR1	NM 005012	09	197	TGGATTCAGTAACCAGGAAGTGA	CCCATTCACCAGGATGATT
ROR1	NM 005012	09	199	GTTCCAGTGCCTACTACC	GCTCGAAACCATGTTCCA
RYK	NM 002958	13	201	CTGGATTTGGGGTCTCTGC	CGGGAACAGCTAGCAGATTTT
TEK	NM 000459	18	203	GGGAATTTGGAGGGAACT	GCTTCAGTACCACAGACCA
TEK	NM 000459	19	205	TGAGTCTACCCAGCAATCATTTG	TTCCGAGAGCTACAGGACA
TIE	NM 005424	18	207	GGTAACAAGGGTACCCACGAA	GTTTGAGGGGCTGAGTGTGG
TIE	NM 005424	19	209	CCTCACCTTAGGGCTTGTG	AGCCAGGTCAAGCCTTAGA
TYRO3	NM 006293	18	211,212	GGGTAGCTGGGAGCAAAGA	CCAAACCCAGAGAGCAAGAC

ES 2 425 749 T3

Tabla S1B: Cebadores para amplificación del EGFR seleccionado y exones de la tirosina quinasa receptora (SEQ ID NOS: 213 – 424)

Gen	RefSeq	Exón	SEQ ID NO	F Externo	R Externo
ALK	NM_004304	24	213,214	CATTTCCCCTAATCCCTTTTCCA	GTGATCCCAGATTTAOGCCTTC
ALK	NM_004304	25	215	GCCTCTCGTGGTTTGTJTGTTC	CCCAGGGTAGGGTCCAATAATC
AXL	NM_021913	19	217	CTTCTGGTGGAGGTGACTGAT	CAGGCATAGTGTGTGATGGTCA
CSF1R	NM_005211	18	219	TCACGATACACATTCTCAGATCC	GAAGATCTCCCAGAGGAGGATG
CSF1R	NM_005211	19	221	CGTAACGTGCTGTGACCAAT	AAACGAGGGGAGAGCCAGAAAAG
DDR1	NM_013994	15	223	TGGGAGCACAATAAAAGAAGA	ACTCTTGGCTCTGGATTCTTG
DDR2	NM_006182	16	225	GGAAAGTCAGTGTGCAGGGAATA	ITTTAGCAGAAATAGGCAAGCA
DKFZp761P1010	NM_018423	8	227	TGGTAATCCTAAACAAATGCAGA	CTGGCAACACAGTGTGATCCT
EGFR	NM_005228	2	229	TCACAAATTCCTTGTGTGTCC	CATGGAACTCCAGATTAGCTGT
EGFR	NM_005228	3	231	GATTGTTCAGATCGTGGACAT	CGCTTAAATCTTCCCAITCCAG
EGFR	NM_005228	4	233	CTCCATGGCACCATCATTAAACA	CTCAGGACACAAGTGTCTGTCT
EGFR	NM_005228	5	235	GCAGTTCATGGTTCATCTTCTTT	CAAAAATAGCCACCCTGGATTA
EGFR	NM_005228	6	237	CITTCGTGATGGCCAAAGATG	CAAGGTCTCAGTGTGATGGTGA
EGFR	NM_005228	7	239	GAGAAGGGTCTTCTGACTCTGC	CAGGTGTTTCTCCTGTGAGGTG
EGFR	NM_005228	8	241	CACATTGCGCCTAGAATGTA	ACCCCGTCAACAACCTTCAGT
EGFR	NM_005228	9	243	GCCGTAGCCCCAAAGTGTACTA	TCAGCTCAAACCTGTGATTTCC
EGFR	NM_005228	10	245	CTCACTCTCCATAAATGCTACGAA	GACTTAACGTGTCCCTTTTTC
EGFR	NM_005228	11	247	GCCTCTTCGGGGTAAATCAGATA	GAAGTCTGTGGTTTAGCGGACA
EGFR	NM_005228	12	249	ATCTTTTGCCTGGAGGAACTTT	CAGGGTAAATTCATCCCATTTGA
EGFR	NM_005228	13	251	CAGCAGCCAGCACAACACTCTT	ITGGCTAGATGAACCATTGATGA
EGFR	NM_005228	14	253	TGAATGAAGCTCCTGTGTTTACTC	ATGTTTACCGCAGGCTAATGTG
EGFR	NM_005228	15	255	AAAACAGGGGAGAACTCTAAGCAA	CATGGCAGAGTCAITCCCACT
EGFR	NM_005228	16	257	CAATGCTAGAACACGCCTGTCT	TCCCTCCACTGAGGACAAAGTT
EGFR	NM_005228	17	259	GGGAGAGCTTGAGAAAGTTGGA	ATTTCTCCGATGGATGTACCA
EGFR	NM_005228	18	261	TCAGAGCCTGTGTTTCTACCAA	TGGTCTCACAGGACCCTGATT
EGFR	NM_005228	19	263	AAATAATCAGTGTGATTCGTGGAG	GAGGCCAGTGTCTCTAAGG
EGFR	NM_005228	20	265	ACTTACAGCCCTGCGTAAAC	ATGGGACAGGCACTGATTTGT
EGFR	NM_005228	21	267	GCAGCGGGTTACATCTTCTTTC	CAGCTCTGGCTCACACTACCAG
EGFR	NM_005228	22	269	CCTGAACCTCCGTCAGACTGAAA	GCAGCTGGACTCGATTTCT
EGFR	NM_005228	23	271	CCTTACAGCAATCCTGTGAAACA	TGCCCAATGAGTCAAGAAGTGT
EGFR	NM_005228	24	273	ATGTACAGTGTGGCATGGTCT	CACTCACGGATGCTGCTTAGTT
EGFR	NM_005228	25	275	TAAGGCACCCACATCATGTCA	TGGACCTAAAAGGCTTACAATCA
EGFR	NM_005228	26	277	GCCTTTTAGTCCACTATGGAATG	CCAGGCGATGCTACTACTGGTC
EGFR	NM_005228	27	279	TCATAGCACACCCTCCCTCACTG	ACACAACAAGAGCTTGTGCAG
EGFR	NM_005228	28	281	CCATTACTTTGAGAAAGGACAGGAA	TATCTTGTGTGATGCGTTTCT
EPHA1	NM_005232	14	283	AGGAGGGCAGAGGACTAGCTG	GGCAATGTGAATGTGCACTG
EPHA1	NM_005232	15	285	CITGAACCTGGGAGGTGGAG	ATCAGGGTGGGAGGAGTAAAGA
EPHA2	NM_004431	13	287	CCCACITACCTCTCACCTGTGC	GTGAACITCCGGTAGGAAATGG
EPHA2	NM_004431	14	289	AGGGGAOCTCAAGGGGAGAAAG	AGATCATGCCAGTGAACCTCCAG
EPHA3	NM_005233	10	291	GGACCAGGAAAGTCCCTTGCTTT	GGTGGGGAACATTAACCTGAGG
EPHA3	NM_005233	11	293	GCTTCAGGTTGTTTGTGTGCAG	ACCCTTGCTTGAGGGGAAATAG
EPHA4	NM_004438	13	295	CCCAGCTCCTAGGGTACAGTCT	CAGTCAGCTTCAAAAATCCCTCTT
EPHA4	NM_004438	14	297	TCATTCCCTGTGAGTAAAGAAA	GGCCAATTAATCTTGTCTTGA
EPHA7	NM_004440	13	299	TGGACTTGTGCAAACCTCAAACCTG	TCCCAATATAGGGCAGTCAATGT
EPHA7	NM_004440	14	301	TCTCAATCAGTTGAGTTGCCTTG	AGCTGTGCAAGTGTGGAAACAT
EPHA8	NM_020526	13	303	GCTGTGAGGGTAAATGAGACCA	GTCTCTGGTGTGACTGTGG
EPHA8	NM_020526	14	305	CCTTCTCTGCTCCACAGC	GTCTTGTGCCAACAGTCGAG
EPHB1	NM_004441	7	307	GCTTGCCAAGGAGAAAGAGAACA	GCTTGCTTCTTGCTTGAACAAC
EPHB1	NM_004441	8	309	GCTGGTCACTTGAGCTTCTCT	CCATGCTGGGCTCTTTGATTA
EPHB2	NM_017449	11	311	CACCACCTGAAAGTTGGCTCT	ATGGCTCTGCACATTTGTTC
EPHB2	NM_017449	12	313	CAGAGTGGGAAAAGGCACCTTCA	CCAGAGTCTGTGCAGACACTTC
EPHB3	NM_004443	11	315	ATGGGGATTAACCTGGGATGTTG	CGTAGCTCCAGACATCACTAGCA
EPHB3	NM_004443	12	317	GCAACCTGGTCTGCAAAGTCTC	ACCCAGCAGTCCAGCATGAG

Tabla S1B (continuación)

EPHB4	NM 004444	14	319	GAGTTTCAGTGAGCCAAGATCG	TTACAGGCTTGAGCCACTAGGC
EPHB6	NM 004445	16	321	AAGCTTCCAGGAGACGAGGTC	GTCCCTGAAATCCCTCAAACC
EPHB6	NM 004445	17	323	TGCTCCATAAACGTGACTATTGC	GTAAGAGGGTGGGCTGGAATCT
ERBB2	NM 004448	21	325	CTTAGACCATGTCCGGGAAAAC	CACATCACTCTGGTGGGTGAAC
ERBB3	NM 001982	21	327	AAATTTTCATCCCAAACCAACC	CCAGTCCCAAGTTCTTGATCATT
FGFR1	NM 000604	14	329	ACAAGTCGGCTAGTTGCATGG	TCTCAGATGAAACCACCAGCAC
FGFR1	NM 000604	15	331	TTCATCTGAGAAGCAAGGAGTGG	CCAGGGAGAAAAGCAGGACTCTA
FGFR2	NM 000141	14	333	TTCTGGCGGTGTTTGAAATTA	CTCAACATTGACGGCCTTCTT
FGFR2	NM 000141	15	335	TCAGCTCTTAAACAGGGCATAGC	GAAATGCAGCAGCCACTAAAGA
FGFR3	NM 000142	13	337	CTCACCTTCAAGGACCTGGTGT	CAGGGAGGGGTAGAAAACCACA
FGFR3	NM 000142	14	339	GGAGAGGTGGAGAGGCTTCAG	GAGACTCCAGGACAGACACCT
FGFR4	NM 002011	14	341	CACTCGTCTCTCAACCCTCC	AGGACTCACACGTCACCTGGT
FGFR4	NM 002011	15	343	GGACAATGTGATGAAGATTGCTG	ATAGCAGGATCCCAAAAGACCA
FLT1	NM 002019	23	345	GGCTTGGGGACCTGTATTTGTA	CAGTGGCCTTCTGAGCCTTAC
FLT1	NM 002019	24	347	GCACCTAGCTCCCTCTTTAGC	TTTTACAGTAGAGGGCAGACATGC
FLT3	NM 004119	20	349	GCCACCATAGCTGCAGAATTAG	CCCAAGGACAGATGTGATGCTA
FLT3	NM 004119	21	351	GCCTTGTGTCGAGAGGAGTTGT	GTTCACGCTCTCAAGCAGGTTA
FLT4	NM 002020	23	353	ATTCACAAGCTCTCTCCATGA	CTTGCCCAAGATGCCAAG
IGF1R	NM 000875	18	355	TGCTTGGTATTGTCTCATCATGT	CCCTTAGCTAGCCCACTGACAA
INSR	NM 000208	18	357	CTCCTGGGAGTGGTGTCCAA	CCTGGGCAACAGACAGAGTAAG
INSR	NM 000208	19	359	CTTCACTTCCCCATGCGTACC	GGGTTCAAAATGCCTACAGGA
KDR	NM 002253	24	361	AAAATCTGTGACTTTGGCTJGG	GGGAGGAGACATCTTTGATTTG
KIT	NM 000222	17	363	GCAGTCCTGAGAAGAAAACAGC	CTTCACATGCCCAAAATTACA
KIT	NM 000222	18	365	TGAGCCAATGATTTCAAGAGTGA	TACATTTCAAGCAGGTGCGTGT
LTK	NM 002344	16	367	TTGCCTACTCTGTAGGGATATTGC	ATAGGGCATGTAGCCCACTGA
MERTK	NM 006343	17	369	GCCTCTGTGTGGTCTCACT	TTGCAAAGCACACATCTTCTGA
MET	NM 000243	19	371	TGGCAATGTCAAATGTCAAGCAT	GTATGTTGCCCACTCAACAAA
MUSK	NM 005592	15 1	373	TGCATTTCTAGCTGAGACTCC	TGCCATCTCGCAGTAGTAAAT
MUSK	NM 005592	15 2	375	CTCTCCTGTGCTGAGCAGCTTT	TGTTTCCAAATCACTGGCTTCA
NTRK1	NM 002529	15	377	GAACCAATGGGCTGTCTCTGG	ATCTGGGATAGCGAAGGAGACA
NTRK1	NM 002529	16	379	ATTACAGGCCACACGCCATC	AAGGCAAGAATAAGGGAGGAAGA
NTRK2	NM 006180	15	381	GCTCTCAGGACTGCAGAAGTACA	GAGGAACCAATCCCACTCACAC
NTRK2	NM 006180	16	383	TCACTCTTGGCTTCTGTCTCTG	GCACCTGTCTTGTCTTCTCAG
NTRK3	NM 002530	17	385	TGTCTCCTTATCGTAGGCTCCA	CACCACATTTCTACAGTTCCA
NTRK3	NM 002530	18	387	CACTGTGCACCAGACAGACAAA	TGTGGTTTCTGTATCAGCAGCTT
PDGFRA	NM 006206	18	389	CAGGGAGTCTGAAATCATCAGG	TCAAGTATCTAGCCCAAAATCCA
PDGFRA	NM 006206	19	391	GGCAATATTGACCATTTCATTC	AGGCCAGGAGTAAGACGCAAC
PDGFRB	NM 002609	18	393	AAGAACGTACGTGTGGTGTGG	CGCTATACTTGTCTCAATGCACT
PDGFRB	NM 002609	19	395	AGGAAACAGCCTCTGGTCTCTC	GTCAATGCTCAGACAGGGAGAT
PTK7	NM 002821	18	397	CCCAGGAAAGCAGGTAAGTTA	TTTTACAACCACCAAGGGTGTG
PTK7	NM 002821	19	399	TCGTGTGGTTACCTCCAGATTTT	AAATTAGCCAGGGAGTGGAGGT
RET	NM 000323	15	401	CATGCCATGTCTATGGCTCAC	AGGCTGAGCCGAGTTCTAATTG
RET	NM 000323	16	403	ATCTCAGCAATCCACAGGAGGT	ATTTGCCTCAGCAACACATCAT
ROR1	NM 005012	09 1	405	TGGAAAGTTGTCTATGGCACCTC	ATGGGCGCAAGGACTTACTCT
ROR1	NM 005012	09 2	407	CACCCCAATATTGTCTGCCTTC	GGCTCGGGAACATGTAATTAGG
ROR1	NM 005012	09 3	409	CCATCATGTATGGCAAATCTCTT	TGGCGTCTCTAGTAAAGATGCT
ROR1	NM 005012	09 4	411	GCCAGATTGCTGGTTTCATTG	GGCTAAAACACAAAGCACCATT
RYK	NM 002958	13	413	GGGAAGTCATCCACAAAGACCT	GGTCTGGGTCACAGCTCCTC
TEK	NM 000459	18	415	TTCTTCTGCCAAGATGTGGTGT	TGCAGATGCTGCAATCATGTTA
TEK	NM 000459	19	417	TGGACCCCGAAAGATAAAATAGG	TTCTGCACTCCTCTGGAAACTG
TIE	NM 005424	18	419	GGGTGAGAGCCAACACTGATCT	CTGTGCCCTCTCATCTCACACT
TIE	NM 005424	19	421	AGAACCTAGCTCCAAGATTGC	ACACCTTCCAAGACTCCTTCCA
TYRO3	NM 006293	18	423,424	GACTCGAGGGTGGGAGACAG	GCTGTCCTAGGTTGCTCTGAGC

Tabla S2: estatus de la mutación del EGFR en cáncer de pulmón no tratado

Muestra	Histología	Fuente	Género	Exón	Alteración de la secuencia	SEQ ID NO	Nucleótido	Aminoácido
S0514	adenocarcinoma	EUA	F	18	Sustitución	425	2155G>A	G719S
S0377	adenocarcinoma	Japón	F	18	Sustitución	426	2155G>A	G719S
S0418	adenocarcinoma	Japón	F	19	Del-1a	427	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0363	cáncer de células grandes	Japón	F	19	Del-1a	428	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0380	adenocarcinoma	Japón	M	19	Del-1a	429	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0399	adenocarcinoma	Japón	F	19	Del-1a	430	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0353	adenocarcinoma	Japón	F	19	Del-1a	431	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0385	adenocarcinoma	Japón	M	19	Del-1a	432	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0301	adenocarcinoma	Japón	M	19	Del-1a	433	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0412	adenocarcinoma	Japón	M	19	Del-1b	434	2236_2250delGAAATTAAGAGAAAGCA	E746_A750del
S0335	adenocarcinoma	Japón	M	19	Del-1b	435	2236_2250delGAAATTAAGAGAAAGCA	E746_A750del
S0405	adenocarcinoma	Japón	F	19	Del-1b	436	2236_2250delGAAATTAAGAGAAAGCA	E746_A750del
S0439	adenocarcinoma	Japón	M	19	Del-2	437	2254_2277delTCTCGCAAAGCCCAACCAAGGAAATC	S752_1759del
S0361	adenocarcinoma	Japón	F	21	Sustitución	438	2573T>G	L858R
S0388	adenocarcinoma	Japón	F	21	Sustitución	439	2573T>G	L858R
S0389	adenocarcinoma	Japón	F	21	Sustitución	440	2573T>G	L858R

Tabla S3A: Estado de la mutación de EGFR en cáncer de pulmón tratado con gefitinib

Sensibilidad al Gefitinib	Muestra	Histología	Fuente	Género	Exones	Alteración de la secuencia	SEQ ID NO	Nucleótido	Aminoácido
Y	IR1T	adenocarcinoma	EUA	M	19	Del-3	441	2239_2247delTTAAGAGAA, 2248G>C	L747_E749d el, A750P
Y	P003	adenocarcinoma	EUA	M	19	Del-3	442	2239_2247delTTAAGAGAA, 2248G>C	L747_E749d el, A750P
Y	IR4T	carcinoma broncoalveolar	EUA	F	19	Del-4	443	2240_2257delTTAAGAGAAGCAACATCTC	L747_S752d el, P753S
Y	IR2T	adenocarcinoma	EUA	F	19	Del-5	444	2238_2255delATTAAAGAGGAGCAACATC, 2237A>T	L747_S752d el, E746V
Y	IR3T	adenocarcinoma	EUA	F	21	Sustitución	445	2573T>G	L858R
Y	IRG	adenocarcinoma	EUA	F	21	Sustitución	446	2573T>G	L858R
<i>in vitro</i>	H3255								
N	IR5	adenocarcinoma	EUA	F	18 - 24	No detectada		n/a	n/a
N	IR6	adenocarcinoma	EUA	M	18 - 24	No detectada		n/a	n/a
N	IR8	adenocarcinoma	EUA	F	18 - 24	No detectada		n/a	n/a
N	IR9	NSCLC	EUA	F	18 - 24	No detectada		n/a	n/a

ES 2 425 749 T3

Tabla S3B: Mutaciones del EGFR no mostradas en la Tabla 2, Tabla S2 o Tabla S3A

Muestra	Tejido	Exón	Alteración de la secuencia	Nucleótido	Aminoácido
Tar4T	Adenocarcinoma de pulmón	19	Supresión	2239-2250delTTAAGAGAAGCA; 2251A>C	L747_A750del; T751T
AD355	Adenocarcinoma de pulmón	19	Supresión	2240-2254delTAAGAGAAGCA	L747_T751del
IR TT	Adenocarcinoma de pulmón	19	Supresión	2257-2271delICCGAAAGCCAACAAG	P753_K757del
AD240	Adenocarcinoma de pulmón	20	Inserción	2309-2310insCAACCCGG	D770_N771ins NPG
AD261	Adenocarcinoma de pulmón	20	Inserción	2311-2312insGCGTGGACA	D770_N771ins SVD
	Adenocarcinoma de pulmón	20	Inserción	2316-2317insGGT	P772_H773ins V
AD356	Adenocarcinoma de pulmón	20	Sustitución	2334-2335GG>AA	G779S
SP02-23	Leucemia mieloide aguda	21	Sustitución	2570G>T	G857V
SP08-94	Glioma	21	Sustitución	2582T>A	L861Q
SP06-45	Sarcoma	21	Sustitución	2648T>C	L883S
AD241	Adenocarcinoma de colon	22	Sustitución	2686G>T	D896Y

Tabla S3C: Posición de los mutantes BCR-ABL resistentes a imatinib y posiciones análogas en EGFR

Residuo de Ab11 sometido a mutación de resistencia	Residuo de EGFR análogo	Idéntico/similar/no conservado
Met-244	Lys-714	No conservado
Leu-248	Leu-718	Idéntico
Gly-250	Ser-720	No conservado
Gln-252	Ala-722	No conservado
Tyr-253	Phe-723	Similar
Glu-255	Thr-725	No conservado
Asp-276	Ala-750	No conservado

ES 2 425 749 T3

(continuación)

Residuo de Ab11 sometido a mutación de resistencia	Residuo de <i>EGFR</i> análogo	Idéntico/similar/no conservado
Thr-315	Thr-790	Idéntico
Phe-317	Leu-792	Similar
Met-351	Met-825	Idéntico
Glu-355	Glu-829	Idéntico
Phe-359	Leu-833	Similar
His-396	His-870	Idéntico
Ser-417	Thr-892	Similar
Phe-486	Phe-961	Idéntico

Tabla S4: Iniciadores utilizados para la secuenciación de ADNc

Nombre del cebador	SEQ ID NO	Secuencia 5' a 3' del cebador
ADNc EGFR aF	447	TGTA AACGACGGCCAGTCGCCAGACCGGACGACA
ADNc EGFR aR	448	CAGGAAACAGCTATGACCAGGGCAATGAGGACATAACCA
ADNc EGFR bF	449	TGTA AACGACGGCCAGTGGTGGTCCTTGGGAATTTGG
ADNc EGFR bR	450	CAGGAAACAGCTATGACCCCATCGACATGTTGCTGAGAAA
ADNc EGFR cF	451	TGTA AACGACGGCCAGTGAAGGAGCTGCCCATGAGAA
ADNc EGFR cR	452	CAGGAAACAGCTATGACCCGTGGCTTCGTCTCGGAAAT
ADNc EGFR dF	453	TGTA AACGACGGCCAGTGAAACTGACCAAAATCATCTGT
ADNc EGFR dR	454	CAGGAAACAGCTATGACCTACCTATTCCGTTACACACTTT
ADNc EGFR eF	455	TGTA AACGACGGCCAGTCCGTAATTATGTGGTGACAGAT
ADNc EGFR eR	456	CAGGAAACAGCTATGACCGCGTATGATTTCTAGGTTCTCA
ADNc EGFR fF	457	TGTA AACGACGGCCAGTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCAC
ADNc EGFR fR	458	CAGGAAACAGCTATGACCCCTGCCTCGGCTGACATTC
ADNc EGFR gF	459	TGTA AACGACGGCCAGTTAAGCAACAGAGGTGAAAACAG
ADNc EGFR gR	460	CAGGAAACAGCTATGACCGGTGTTGTTTTCTCCATGACT
ADNc EGFR hF	461	TGTA AACGACGGCCAGTGGACCAGACAACGTATCCA
ADNc EGFR hR	462	CAGGAAACAGCTATGACCTTCCTTCAAGATCCTCAAGAGA
ADNc EGFR iF	463	TGTA AACGACGGCCAGTGATCGGCCTTTCATGCGAA
ADNc EGFR iR	464	CAGGAAACAGCTATGACCACGGTGGAGGTGAGGCAGAT
ADNc EGFR jF	465	TGTA AACGACGGCCAGTCGAAAGCCAACAAGGAAATCC
ADNc EGFR jR	466	CAGGAAACAGCTATGACCATTCCAATGCCATCCACTTGAT
ADNc EGFR kF	467	TGTA AACGACGGCCAGTAACACCGCAGCATGTCAAGAT
ADNc EGFR kR	468	CAGGAAACAGCTATGACCCTCGGGCCATTTGGAGAATT
ADNc EGFR lF	469	TGTA AACGACGGCCAGTTCAGCCACCCATATGTACCAT
ADNc EGFR lR	470	CAGGAAACAGCTATGACCGCTTTCAGCCATTTCTATC
ADNc EGFR mF	471	TGTA AACGACGGCCAGTACAGCAGGGCTTCTTCAGCA
ADNc EGFR mR	472	CAGGAAACAGCTATGACCTGACACAGGTGGGCTGGACA
ADNc EGFR nF	473	TGTA AACGACGGCCAGTGAATCCTGTCTATCACAATCAG
ADNc EGFR nR	474	CAGGAAACAGCTATGACCGGTATCGAAAGAGTCTGGATT
ADNc EGFR oF	475	TGTA AACGACGGCCAGTGCTCCACAGCTGAAAATGCA
ADNc EGFR oR	476	CAGGAAACAGCTATGACCACGTTGCAAAACAGTCTGTG

Los siguientes párrafos numerados definen aspectos particulares de la presente invención:

- 5 1. Un método para determinar la probabilidad de la efectividad de un tratamiento dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un paciente humano afectado con o en riesgo de desarrollar cáncer, que comprende: la detección de la presencia o ausencia de al menos una variación de ácido nucleico en el dominio quinasa del gen erbB1 de dicho paciente en relación con el gen erbB1 de tipo silvestre, en donde la presencia de al menos una variación de ácido nucleico indica que el tratamiento dirigido al EGFR es probable que sea efectivo.
2. El método del párrafo 1, en donde la variación de ácido nucleico aumenta la actividad de quinasa.
- 10 3. El método del párrafo 1, en donde el gen erbB1 se obtiene partir de una muestra biológica de dicho paciente.
4. El método del párrafo 1, en donde la variación en el dominio quinasa del gen erbB1 elabora la estructura conformacional del bolsillo de enlazamiento de ATP.
5. El método del párrafo 1, en donde la variación en el dominio quinasa de erbB1 está en un exón del gen erbB1 seleccionado del grupo que consiste del exón 18, 19, 20 o 21.

6. El método del párrafo 5, en donde la variación es en el exón 18, 19 o 21.
7. El método del párrafo 1, en donde la variación en el dominio quinasa del gen erbB1 es una supresión, sustitución, o inserción en el marco.
8. El método del párrafo 7, en donde la supresión en el marco es en el exón 19 del gen erbB1.
- 5 9. El método del párrafo 8, en donde la supresión en el marco en el exón 19 del gen erbB1 comprende una supresión de al menos los aminoácidos leucina, arginina, ácido glutámico y alanina, en los codones 747, 748, 749 y 750 de la SEQ ID NO: 512.
- 10 10. El método del párrafo 8, en donde la supresión en el marco en el exón 19 del gen erbB1 comprende una supresión de al menos los aminoácidos leucina, arginina y ácido glutámico en el codón 747, 748 y 749 de la SEQ ID NO: 512.
11. El método del párrafo 8, en donde la supresión en el marco comprende los nucleótidos seleccionados del grupo que consiste de 2235 - 2249, 2240 - 2251 y 2240 - 2257 de la SEQ ID NO: 511.
12. El método del párrafo 7, en donde la sustitución es en el exón 21 del gen erbB1.
13. El método del párrafo 12, en donde la sustitución en el exón 21 comprende al menos un aminoácido.
- 15 14. El método del párrafo 12, en donde la sustitución en el exón 21 comprende una sustitución del grupo que consiste de una guanina por una timina en el nucleótido 2573 de la SEQ ID NO: 511, y una adenina para una timina en el nucleótido 2582 de la SEQ ID NO: 511.
15. El método del párrafo 7, en donde la sustitución es en el exón 18 del gen erbB1.
- 20 16. El método del párrafo 15, en donde la sustitución en el exón 18 es una timina por una guanina o una serina por una guanina en el nucleótido 2155 de la SEQ ID NO: 511.
17. El método del párrafo 1, en donde la detección de la presencia o ausencia de dicha al menos una variación comprende la amplificación de un segmento de ácido nucleico.
18. El método del párrafo 17, en donde el segmento que va a ser amplificado es de 1000 nucleótidos de longitud o menos.
- 25 19. El método del párrafo 17, en donde el segmento que va a ser amplificado incluye una pluralidad de variaciones.
20. El método del párrafo 1, en donde la detección de la presencia o ausencia de dicha al menos una variación comprende poner en contacto el ácido nucleico de erbB1 con al menos una sonda de ácido nucleico, en donde dicha al menos una sonda preferentemente se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que comprende dicha variación en condiciones de hibridación selectivas.
- 30 21. El método del párrafo 1, en donde la detección de la presencia o ausencia de dicha al menos una variación comprende la secuenciación de al menos una secuencia de ácido nucleico.
22. El método del párrafo 1, en donde la detección de la presencia o ausencia de dicha al menos una variación comprende la determinación por espectrometría de masas de al menos una secuencia de ácido nucleico.
- 35 23. El método del párrafo 1, en donde la detección de la presencia o ausencia de dicha al menos una variación comprende llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar ácido nucleico que comprende la secuencia de codificación de erbB1, y la determinación de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado.
24. El método del párrafo 23, en donde la determinación de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado comprende la secuenciación de al menos un segmento de ácido nucleico.
- 40 25. El método del párrafo 23, en donde la determinación de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado comprende correr el segmento de ácido nucleico amplificado sobre un gel y la determinación del tamaño de los segmentos.

26. El método del párrafo 1, en donde la detección de la presencia o ausencia de dicha al menos una variación comprende determinar el haplotipo de una pluralidad de variaciones en un gen.
27. Una sonda que se enlaza específicamente en condiciones de enlazamiento selectivas a una secuencia de ácido nucleico que comprende por lo menos una variación en el gen erbB1, en donde la variación es una mutación en el dominio quinasa de erbB1 que confiere un cambio estructural en el bolsillo de enlazamiento de ATP.
28. La sonda del párrafo 27, en donde dicha variación es en un exón del gen erbB1 seleccionado del grupo que consiste del exón 18, 19, 20 o 21.
29. La sonda del párrafo 27, en donde dicha sonda comprende una secuencia de ácido nucleico de 500 bases de nucleótidos o menos de longitud.
30. La sonda del párrafo 27, en donde dicha sonda comprende ADN.
31. La sonda del párrafo 27, en donde dicha sonda comprende ADN y al menos un análogo de ácido nucleico.
32. La sonda del párrafo 27, en donde dicha sonda comprende ácido nucleico peptídico (PNA).
33. La sonda del párrafo 27, que comprende además un marcador detectable.
34. La sonda del párrafo 27, en donde el marcador detectable es un marcador fluorescente.
35. La sonda del párrafo 27, en donde dicha sonda comprende al menos 10 ácidos nucleicos consecutivos que consisten de al menos los ácidos nucleicos 15 - 25 de la SEQ ID NO 495, o sus adiciones.
36. La sonda del párrafo 27, en donde dicha sonda comprende al menos 10 ácidos nucleicos consecutivos que consisten de al menos los ácidos nucleicos 20 - 30 de la SEQ ID NO 497, o sus adiciones.
37. La sonda del párrafo 27, en donde dicha sonda comprende al menos 10 ácidos nucleicos consecutivos que consisten de al menos los ácidos nucleicos 20 - 30 de la SEQ ID NO 499, o sus adiciones.
38. Un método para determinar la probabilidad de la efectividad de un tratamiento dirigido al EGFR en un paciente que comprende:
- la determinación de la actividad de la quinasa del gen erbB1 en una muestra biológica de dicho paciente, en donde un incremento en actividad de la quinasa después de la estimulación con un ligando del EGFR, en comparación con un control, indica que el tratamiento dirigido al EGFR es probable que sea efectivo.
39. El método de los párrafos 1 y 38, en donde el tratamiento dirigido al EGFR es un inhibidor de la tirosina quinasa.
40. El método del párrafo 39, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es una anilinoquinazolina.
41. El método del párrafo 40, en donde la anilinoquinazolina es una anilinoquinazolina sintética.
42. El método del párrafo 41, en donde la anilinoquinazolina sintética se selecciona del grupo que consiste de gefitinib y erlotinib.
43. Un método para determinar la probabilidad de la efectividad de un tratamiento dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un paciente humano afectado con o en riesgo de desarrollar cáncer, que comprende:
- a. la detección de la presencia o ausencia de al menos una variación de ácido nucleico en el exón 18, 19, 20 o 21 mediante la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una porción del exón 18, 19, 20, o 21; y
- b. la determinación de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado por secuenciación de al menos una porción del exón amplificado 18, 19, 20, o 21, en donde la presencia de al menos una variación de nucleótidos en el exón 18, 19, 20 o 21 en comparación con un control de erbB1 de tipo silvestre indica que el tratamiento dirigido al EGFR es probable que sea efectivo.

44. Un método de tratamiento de un paciente afectado con o en riesgo de desarrollar cáncer, que comprende detectar la presencia o ausencia de al menos una variación de ácido nucleico en el dominio quinasa del gen erbB1 del paciente, en donde se le administra al paciente un tratamiento dirigido al EGFR si se detecta la presencia de dicha al menos una variación de ácido nucleico.
- 5 45. Un método de tratamiento de un paciente afectado con o en riesgo de desarrollar cáncer, que comprende:
- a. detectar la presencia o ausencia de al menos una variación de ácido nucleico en el exón 18, 19, 20 o 21 mediante la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una porción del exón 18, 19, 20, o 21,
- 10 b. determinar la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado por medio de la secuenciación de al menos una porción del exón amplificado 18, 19, 20 o 21; y
- c. administrar un tratamiento dirigido al EGFR al paciente si se detecta la presencia de dicha al menos una variación de ácido nucleico.
46. El método de los párrafos 44 y 45, en donde el tratamiento dirigido al EGFR es un inhibidor de la tirosina quinasa.
- 15 47. El método del párrafo 46, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es una anilinoquinazolina.
48. El método del párrafo 47, en donde la anilinoquinazolina es una anilinoquinazolina sintética.
49. El método del párrafo 48, en donde la anilinoquinazolina sintética se selecciona del grupo que consiste de gefitinib y erlotinib.
- 20 50. El método de los párrafos 44 y 45, en donde se obtiene el gen erbB1 a partir de una muestra biológica de dicho paciente.
51. El método de los párrafos 44 y 45, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga.
- 25 52. El método del párrafo 51, en donde dicho cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
53. El método de los párrafos 44 y 45, en donde la variación de ácido nucleico aumenta la actividad de la quinasa.
54. El método de los párrafos 44 y 45, en donde la variación en el dominio quinasa del gen erbB1 efectúa la conformación del bolsillo de enlazamiento de ATP.
- 30 55. El método de los párrafos 44 y 45, en donde la variación en el dominio quinasa de erbB1 es en un exón del gen erbB1 seleccionado de entre el grupo que consiste del exón 18, 19, 20 o 21.
56. El método del párrafo 55, en donde la variación es en el exón 18, 19 o 21.
57. El método de los párrafos 44 y 45, en donde la variación en el dominio quinasa del gen erbB1 es una supresión o una sustitución en el marco.
58. El método del párrafo 57, en donde la supresión en el marco es en el exón 19 del gen erbB1.
- 35 59. El método del párrafo 58, en donde la supresión en el marco en el exón 19 del gen erbB1 comprende una supresión de por lo menos los aminoácidos leucina, arginina, ácido glutámico y alanina, en los codones 747, 748, 749 y 750.
- 40 60. El método del párrafo 58, en donde la supresión en el marco en el exón 19 del gen erbB1 comprende una supresión de por lo menos los aminoácidos leucina, arginina, glutamina y ácido en el codón 747, 748 y 749 de la SEQ ID NO. 512.
61. El método del párrafo 59, en donde la supresión en el marco comprende los nucleótidos seleccionados de entre el grupo que consiste de 2235 - 2249, 2240 - 2251, y 2240 - 2257 de la SEQ ID NO: 511.

62. El método del párrafo 57, en donde la sustitución es en el exón 21 del gen erbB1.
63. El método del párrafo 62, en donde la sustitución en el exón 21 comprende una sustitución del grupo que consiste de una guanina por una timina en el nucleótido 2573 de la SEQ ID NO: 511, y una adenina para una timina en el nucleótido 2582 nucleótidos de la SEQ ID NO: 511.
- 5 64. El método del párrafo 62, en donde la sustitución en el exón 21 comprende al menos un aminoácido.
65. El método del párrafo 57, en donde la sustitución es en el exón 18 del gen erbB1.
66. El método del párrafo 65, en donde la sustitución en el exón 18 es una timina por una guanina en el nucleótido 2155 de la SEQ ID NO: 511.
67. Un kit que comprende:
- 10 a. al menos un par cebador degenerado diseñado para hibridar con regiones de ácido nucleico limítrofes o dentro del exón 18, 19, 20 o 21 del dominio quinasa del EGFR;
- b. productos y reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación por PCR, e
- c. instrucciones.
- 15 68. Un kit de acuerdo con el párrafo 67, en donde el cebador comprende la secuencia de los cebadores seleccionados de entre el grupo consiste de las SEQ ID NOS: 505 - 508, y las SEQ ID NOS: 646 - 673 con la SEQ ID NO: 645 en el extremo 5' de todos los cebadores hacia delante y la SEQ ID NO: 674 en el extremo 5' de todos los cebadores inversos.
69. Un kit que comprende:
- 20 a. al menos una sonda diseñada para hibridar con regiones de ácido nucleico dentro de los exones 18, 19, 20 o 21 del dominio quinasa del EGFR;
- b. productos y reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de hibridación; e
- c. instrucciones.
70. El kit del párrafo 69, en donde al menos una sonda está unida a un soporte sólido.
71. Un kit que comprende:
- 25 a. al menos una sonda diseñada para enlazarse al bolsillo de enlazamiento de ATP de la proteína del dominio quinasa del EGFR;
- b. los productos y los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de enlazamiento; e
- c. instrucciones.
- 30 72. El kit de acuerdo con el párrafo 71, en donde la sonda es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo quimérico.
73. El kit de acuerdo con el párrafo 72, en donde la sonda comprende además un marcador detectable.
74. Un método para seleccionar un compuesto que inhibe la actividad catalítica de la quinasa de una variante del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende:
- a. poner en contacto el compuesto con una variante del EGFR; y
- 35 b. la detección de la actividad de la quinasa resultante de la variante del EGFR, en donde se selecciona un compuesto que inhibe la actividad de la quinasa de la variante del EGFR.
75. El método del párrafo 74, en donde se marca la variante del EGFR.

76. El método del párrafo 74, en donde la variante del EGFR se une a un soporte sólido.
77. El método del párrafo 74, en donde dicho soporte sólido es un chip de proteína.
- 5 78. Un compuesto que inhibe la actividad catalítica de la quinasa de una variante del EGFR como se identifica en el párrafo 74, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula pequeña, un péptido, una proteína, un ácido nucleico antisentido, una ribozima, PNA, ARNpi, un aptámero de oligonucleótido, y un aptámero de péptido.
79. El método del párrafo 74, en donde el EGFR variante comprende una mutación secundaria en el dominio quinasa del gen erbB1.
- 10 80. Una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la actividad quinasa del EGFR identificado en los párrafos 74 - 79.
81. Un método de tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad mediada por EGFR, que comprende administrar a dicho paciente la composición farmacéutica del párrafo 80.
82. El método del párrafo 81, en donde la enfermedad mediada por EGFR es cáncer.
- 15 83. El método del párrafo 82, en donde el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga.
84. El método del párrafo 83, en donde el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 20 85. Un método para predecir la adquisición de mutaciones secundarias en el dominio quinasa del gen erbB1 que comprende:
- a. poner en contacto una célula que tiene una forma variante del gen erbB1 con una dosis subletal de un inhibidor de la tirosina quinasa,
- b. seleccionar células que sean resistentes a un efecto de detención del crecimiento del inhibidor de la tirosina quinasa; y
- 25 c. analizar el ácido nucleico de erbB1 de dichas células resistentes por la presencia de mutaciones secundarias en el dominio quinasa de erbB1.
86. El método del párrafo 85, en donde la célula está in vitro.
87. El método del párrafo 85, en donde se obtiene la célula de un animal transgénico.
88. El método del párrafo 87, en donde el animal transgénico es un ratón.
- 30 89. El método del párrafo 87, en donde se obtiene la célula a partir de una biopsia de tumor.
90. El método del párrafo 85, que comprende además poner en contacto primero las células con una cantidad efectiva de un agente mutagénico.
- 35 91. El método del párrafo 90, en el que el agente mutagénico se selecciona de entre el grupo que consiste de metanosulfonato de etilo (EMS), N-etil-N-nitrosourea (ENU), N-metil-N-nitrosourea (MNU), clorhidrato de focarbaxina (Prc), metanosulfonato de metilo (MEMS), clorambucilo (chl), melfalán, clorhidrato procarbazona, ciclofosfamida (Cp), sulfato de dietilo (Et₂SO₄), monómero de acrilamida (AA), metilén melamina (TEM), mostaza de nitrógeno, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfán, y metanosulfonato de etilo (EtMs).
- 40 92. El método del párrafo 85, que comprende además la propagación de una forma variante del gen EGFR en una cepa bacteriana deficiente en la reparación del ADN antes de introducirlo en una célula.
93. Un método para seleccionar un compuesto que comprende poner en contacto el compuesto con una variante del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que tiene una mutación secundaria en el dominio quinasa y la

detección de la actividad resultante de la quinasa, en donde se selecciona un compuesto que inhibe la actividad de la quinasa del EGFR variante.

94. El método del párrafo 93, en donde la mutación secundaria da como resultado una resistencia a gefitinib o erlotinib.

5 95. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 495.

96. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 511, en donde se suprimen los nucleótidos 2235 a 2249.

97. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 497.

10 98. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 511, en donde se suprimen los nucleótidos 2240 a 2251.

99. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 499.

100. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 511, en donde se suprimen los nucleótidos 2240 a 2257.

101. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 502.

15 102. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 511, en donde se sustituye la guanina en el nucleótido 2573 por una timina.

103. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 504.

104. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 511, en donde se sustituye la adenina en el nucleótido 2582 por una timina.

20 105. Un ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 511, en donde se sustituye una timina en el nucleótido 2155 por una guanina.

106. Una proteína aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 512, en donde se suprimen los aminoácidos 746 a 750.

25 107. Una proteína aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 512, en donde se suprimen los aminoácidos 747 - 751.

108. Una proteína aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 512, en donde se suprimen los aminoácidos 747 a 753.

109. Una proteína aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 512, en donde se sustituye la leucina en el aminoácido 858 con una arginina.

30 110. Una proteína aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 512, en donde se sustituye la leucina en el aminoácido 861 con una glutamina.

111. Una proteína aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 512, en donde se sustituye la glicina en el aminoácido 719 con una cisteína.

35 112. El método del párrafo 1, en donde la variación de ácido nucleico del gen erbB1 se selecciona de entre el grupo que consiste de una sustitución de una timina por una guanina o una serina por una guanina en el nucleótido 2155 de la SEQ ID NO 511, una supresión de nucleótidos 2235 a 2249, 2240 a 2251, 2240 a 2257, 2236 a 2250, 2254 a 2277 o 2236 a 2244 de la SEQ ID NO: 511, y una sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 2573 o una adenina para una timina en el nucleótido 2582 de la SEQ ID NO: 511.

40 113. Un método para determinar la probabilidad de efectividad de un tratamiento dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un paciente afectado con o en riesgo de desarrollar cáncer, que comprende:

a. obtener una muestra biológica de dicho paciente; y

b. determinar si Akt, STAT5 o STAT3 se activan en dicho paciente, en donde Akt, STAT5, o STAT3 activados indican que dicho tratamiento dirigido al EGFR es probable que sea efectivo.

114. El método del párrafo 113, en donde la muestra biológica es una biopsia o un aspirado.

115. El método del párrafo 113, en donde Akt, STAT3, o STAT5 activado está fosforilado.

5 116. El método del párrafo 113, en donde el Akt, STAT5, o STAT3 activado se determina inmunológicamente.

117. El método del párrafo 116, en donde los métodos de detección inmunológica se seleccionan del grupo que consiste de inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, barrido por FACS, inmunotransferencia, radioinmunoensayos, transferencia tipo Western, inmunoprecipitación, o ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA).

10 118. El método del párrafo 116, en donde el método de detección inmunológica es inmunohistoquímica o inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-fosfo Akt, anti-fosfo STAT3 o anti-fosfo STAT5.

Referencias

1. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 92 - 98.

15 2. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1031 - 1037.

3. Arteaga CL. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res*. 2003; 284: 122 - 30.

4. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res* 2003; 284: 31 - 53

20 5. Luetkeke NC, Phillips HK, Qui TH, Copeland NG, Earp HS, Jenkins NA, Lee DC. The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev* 1994; 8: 399 - 413.

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

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

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

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

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

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

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

13. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR et al. ZD1839 (Iressa): An orally active inhibitor of Epidermal Growth Factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002;62:5749-5754.

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

(HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001; 61: 8887 - 8895.

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

5 16. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, et al. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 2240 - 2250.

10 17. Herbst RS, Maddox A-M, Rothernberg ML, et al. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD 1839 is generally well tolerated and has activity in non-small cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 3815 - 3825.

18. Baselga J, Rischin JB, Ranson M, et al. Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin One* 2002; 20: 4292 - 4302.

15 19. Albanell J, Rojo F, Averbuch S, et al. Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J Clin Oncol.* 2001; 20: 110 - 124.

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

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

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

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

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

25. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD 1839; Iressa) Tablets. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1212 - 1218.

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

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

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

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

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

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

32. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 906 - 7.
33. Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 2003; 300: 949.
- 5 34. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824 - 30.
35. Heinrich, MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342-4349.
36. Li B, Chang C, Yuan M, McKenna WG, Shu HG. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res* 2003; 63: 7443 - 7450.
- 10 37. C. L. Sawyers, *Genes Dev* 17, 2998 - 3010 (2003).
38. G. D. Demetri et al., *N Engl J Med* 347, 472 - 80 (2002).
39. B. J. Druker et al., *N Engl J Med* 344, 1038 - 42. (2001).
40. D. J. Slamon et al., *N Engl J Med* 344, 783 - 92 (2001).
41. H. Davies et al., *Nature* 417, 949 - 54 (2002).
- 15 42. Bardelli et al., *Science* 300, 949 (2003).
43. Y. Samuels et al., *Science* (2004).
44. Jemal et al., *CA Cancer J Clin* 54, 8 - 29 (2004).
45. S. Breathnach et al., *J Clin Oncol* 19, 1734 - 1742 (2001).
46. V. Rusch et al., *Cancer Res* 53, 2379 - 85 (1993).
- 20 47. R. Bailey et al., *Lung Cancer* 41 S2, 71 (2003).
48. M. Fukuoka et al., *J Clin Oncol* 21, 2237 - 46 (2003).
49. P. A. Janne et al., *Lung Cancer* 44,221 - 230 (2004).
50. M. G. Kris et al., *Jama* 290, 2149 - 58 (2003).
51. V. A. Miller et al., *J Clin Oncol* 22,1103 - 9 (2004).
- 25 52. M. Huse, J. Kuriyan, *Cell* 109, 275 - 82 (2002).
53. K. Naoki, T. H. Chen, W. G. Richards, D. J. Sugarbaker, M. Meyerson, *Cancer Res* 62, 7001 - 3 (2002).
54. J. Stamos, M. X. Sliwkowski, C. Eigenbrot, *J Biol Chem* 277, 46265 - 72 (2002).
55. T. Fujishita et al., *Oncology* 64, 399 - 406 (2003).
56. M. Ono et al., *Mol Cancer Ther* 3, 465 - 472 (2004).
- 30 57. M. C. Heinrich et al., *J Clin Oncol* 21, 4342 - 9 (2003).
58. G. Giaccone et al., *J Clin Oncol* 22, 777 - 84 (2004).
59. R. S. Herbst et al., *J Clin Oncol* 22, 785 - 94 (2004).
60. H. Yamazaki et al., *Mol Cell Biol* 8, 1816 - 20 (1988).

61. M. E. Gorre et al., *Science* 293, 876 - 80 (2001).
62. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al: EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23: 857 - 65, 2005.
- 5 63. Franklin WA: Diagnosis of lung cancer: pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest* 117: 80S - 89S, 2000.
64. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497 - 500, 2004.
- 10 65. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129 - 39, 2004.
66. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al: EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13306 - 11, 2004
- 15 67. Huang SF, Liu HP, Li LH, et al: High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res* 10: 8195 - 203, 2004.
68. Han SW, Kim TY, Hwang PG, et al: Predictive and Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Gefitinib. *J Clin Oncol*, 2005.
69. Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, et al: The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and
20 clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 11: 1167 - 73, 2005.
70. Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al: Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene Predict Prolonged Survival After Gefitinib Treatment in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer With Postoperative Recurrence. *J Clin Oncol*, 2005.
71. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al: KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib
25 or Erlotinib. *PLoS Med* 2:e17, 2005
72. Read WL, Page NC, Tierney RM, et al: The epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma over the past two decades: analysis of the SEER database. *Lung Cancer* 45: 137 - 42, 2004.
73. Sanderson Cox L, Sloan JA, Patten CA, et al: Smoking behavior of 226 patients with diagnosis of stage IIIA/IIIB nonsmall cell lung cancer. *Psychooncology* 11: 472 - 8, 2002.
- 30 74. Radzikowska E, Glaz P, Roszkowski K: Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Ann Oncol* 13: 1087 - 93, 2002.
75. Tong L, Spitz MR, Fueger JJ, et al: Lung carcinoma in former smokers. *Cancer* 78: 1004 - 10, 1996.
76. de Perrot M, Licker M, Bouchardy C, et al: Sex differences in presentation, management, and prognosis of patients with non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119: 21 - 6, 2000
- 35 77. Capewell S, Sankaran R, Lamb D, et al: Lung cancer in lifelong non-smokers. Edinburgh Lung Cancer Group. *Thorax* 46: 565 - 8, 1991
78. Gritz ER, Nisenbaum R, Elashoff RE, et al: Smoking behavior following diagnosis in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Causes Control* 2: 105 - 12, 1991
- 40 79. Sridhar KS, Raub W.A, Jr.: Present and past smoking history and other predisposing factors in 100 lung cancer patients. *Chest* 101: 19 - 25, 1992
80. Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, et al: Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest*

112: 1474 - 9, 1997

81. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al: Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 97: 339 - 46, 2005

5 82. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al: Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 64: 8919 - 23, 2004

83. Cho D, Kocher O, Tenen DG, et al: Unusual cases in multiple myeloma and a dramatic response in metastatic lung cancer: case 4. Mutation of the epidermal growth factor receptor in an elderly man with advanced, gefitinib-responsive, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 235 - 7, 2005.

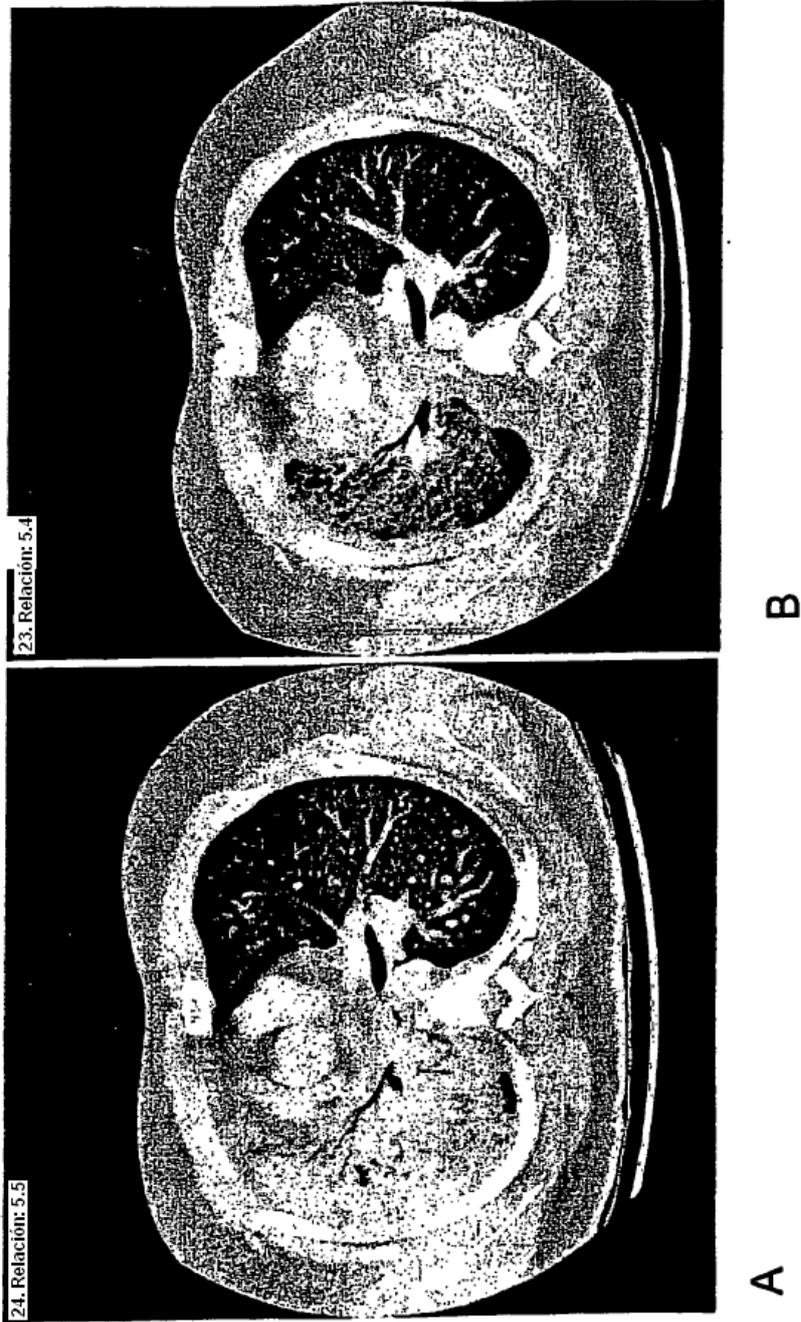
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar la probabilidad de efectividad de un inhibidor de tirosina quinasa del EGFR para tratar cáncer en un paciente afectado con cáncer, que comprende: determinar si el gen erbB1 obtenido a partir de una muestra biológica obtenida de dicho paciente comprende al menos una variación de ácido nucleico, seleccionado de:
- a. una mutación en el exón 18 que resulta en una sustitución de cisteína por glicina en la posición 719 de la SEQ ID NO: 763 (G719C) o en una sustitución de serina por glicina en la posición 719 de la SEQ ID NO: 763 (G719S);
- b. una supresión en el marco en el exón 19 que resulta en una supresión de al menos los aminoácidos leucina, arginina, ácido glutámico y alanina en los codones 747, 748, 749, y 750 de la SEQ ID NO: 763; o
- 10 c. una mutación en el exón 21 que resulta en una sustitución de aminoácido de arginina por leucina en la posición 858 de la SEQ ID NO: 763 (L858R) o de glutamina por leucina en la posición 861 de la SEQ ID NO: 763 (L861Q);
- 15 en donde la muestra biológica es una muestra de tejido o de fluido aislada del paciente y en donde la presencia de al menos una variación de ácido nucleico indica que el inhibidor de tirosina quinasa del EGFR es probable que sea efectivo; y en donde el cáncer se selecciona de cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra biológica se selecciona de sangre, plasma, suero, biopsia del tumor, orina, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, aspirados de pezón, fluido linfático, las secciones externas de la piel, las vías respiratorias, resección intestinal y genitourinaria, biopsia broncoscópica y bloque de células del líquido pleural.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es una anilinoquinazolina.
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es una anilinoquinazolina sintética.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es gefitinib.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es erlotinib.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es un inhibidor irreversible de la tirosina quinasa.
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cáncer es NSCLC.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la mutación en el exón 18 que resulta en G719C comprende una sustitución de timina por guanina en el nucleótido 2155 de la SEQ ID NO: 763.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la mutación en el exón 18 que resulta en G719S comprende una sustitución de adenina por guanina en el nucleótido 2155 de la SEQ ID NO: 763.
- 35 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los aminoácidos 746 - 750 de la SEQ ID NO: 763.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2235 - 2249 de la SEQ ID NO: 763.
- 40 13. El método de la reivindicación 11, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2240 - 2251 de la SEQ ID NO: 763.
14. El método de la reivindicación 11, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2240 - 2257 de la SEQ ID NO: 763.

15. El método de la reivindicación 11, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2239 - 2247 de la SEQ ID NO: 763, junto con una sustitución de citosina por guanina en el nucleótido 2248 de la SEQ ID NO: 763.
- 5 16. El método de la reivindicación 11, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2240 - 2250 de la SEQ ID NO: 763.
17. El método de la reivindicación 11, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2239 - 2250 de la SEQ ID NO: 763, junto con una sustitución de citosina por adenina en el nucleótido 2251 de la SEQ ID NO: 763.
- 10 18. El método de la reivindicación 11, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2238 - 2255 de la SEQ ID NO: 763, junto con una sustitución de timina por adenina en el nucleótido 2237 de la SEQ ID NO: 763.
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la mutación en el exón 21 comprende una sustitución de guanina por timina en el nucleótido 2573 de la SEQ ID NO: 763.
- 15 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la mutación en el exón 21 comprende una sustitución de adenina por timina en el nucleótido 2582 de la SEQ ID NO: 763.
- 20 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde determinar si el gen *erbB1* comprende al menos una variación de ácido nucleico utiliza ADN o ARN recolectado de muestras biológicas y se lleva a cabo por medio de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), hibridación con sondas específicas del alelo, detección de la mutación enzimática, escisión química de las faltas de correspondencia, espectrometría de masas o secuenciación de ADN.
22. El método de la reivindicación 21, en donde en la PCR se separan los productos de la amplificación utilizando diferencias de secuencia, usando polimorfismo de conformación monocatenario (SSCP), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), electroforesis en gel sensible a la temperatura (TSGE), escisión química o polimorfismos de fragmentos de restricción, o hibridación con una matriz de ácido nucleico.
- 25 23. Un inhibidor de la tirosina quinasa del EGFR para uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente afectado con cáncer, comprendiendo el método: determinar a partir de una muestra biológica obtenida del paciente si el dominio quinasa del gen *erbB1* del paciente comprende al menos una variación de ácido nucleico que indica que un tratamiento dirigido al EGFR será efectivo en el paciente, en donde la muestra biológica es una muestra de tejido o de fluido aislada del paciente y la variación se selecciona de variaciones como se define en la reivindicación 1 (a), reivindicación 1 (b) y reivindicación 1 (c); y administrar una cantidad efectiva del inhibidor de la tirosina quinasa a dicho paciente; en donde
- 30 el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, NSCLC, cáncer del sistema nervioso, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga.
- 35 24. El inhibidor de la tirosina quinasa para su uso como en la reivindicación 23, en donde la muestra biológica se selecciona de sangre, plasma, suero, biopsia de tumor, orina, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, aspirados de pezón, fluido linfático, las secciones externas de la piel, tracto respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células, tumores, órganos, resección, biopsia broncoscópica y bloques de células del líquido pleural.
- 40 25. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 y 24, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es una anilinoquinazolina.
26. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es una anilinoquinazolina sintética.
- 45 27. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 y 24, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es gefitinib.
28. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 y 24, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es erlotinib.

29. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 y 24, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa es un inhibidor irreversible de la tirosina quinasa.
30. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 y 24, en donde el cáncer es NSCLC.
- 5 31. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, en donde la mutación en el exón 18 que resulta en G719C comprende una sustitución de timina por guanina en el nucleótido 2155 de la SEQ ID NO: 763.
- 10 32. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, en donde la mutación en el exón 18 que resulta en G719S comprende una sustitución de adenina por guanina en el nucleótido 2155 de la SEQ ID NO: 763.
33. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los aminoácidos 746 - 750 de la SEQ ID NO: 763.
34. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en la reivindicación 33, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2235 - 2249 de la SEQ ID NO: 763.
- 15 35. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en la reivindicación 33, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2240 - 2251 de la SEQ ID NO: 763.
36. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en la reivindicación 33, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2240 - 2257 de la SEQ ID NO: 763.
- 20 37. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en la reivindicación 33, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2239 - 2247 de la SEQ ID NO: 763, junto con una sustitución de citosina por guanina en el nucleótido 2248 de la SEQ ID NO: 763.
38. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en la reivindicación 33, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2240 - 2250 de la SEQ ID NO: 763.
- 25 39. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en la reivindicación 33, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2239 - 2250 de la SEQ ID NO: 763, junto con una sustitución de citosina por adenina en el nucleótido 2251 de la SEQ ID NO: 763.
40. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en la reivindicación 33, en donde la supresión en el marco en el exón 19 comprende una supresión de los nucleótidos 2238 - 2255 de la SEQ ID NO: 763, junto con una sustitución de timina por adenina en el nucleótido 2237 de la SEQ ID NO: 763.
- 30 41. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, en donde la mutación en el exón 21 comprende una sustitución de guanina por timina en el nucleótido 2573 de la SEQ ID NO: 763.
42. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, en donde la mutación en el exón 21 comprende una sustitución de adenina por timina en el nucleótido 2582 de la SEQ ID NO: 763.
- 35 43. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 42, en donde la determinación del dominio quinasa del gen erbB1 de dicho paciente que contiene una forma del gen erbB1 que comprende al menos una variación de ácido nucleico seleccionada de las variaciones como se define en la reivindicación 1 (a), reivindicación 1 (b) y reivindicación 1 (c) utiliza ADN o ARN recolectado de muestras biológicas y se realiza por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación con sondas específicas del alelo, detección de la mutación enzimática, escisión química de las faltas de correspondencia, espectrometría de masas o secuenciación de ADN.
- 40 44. El inhibidor de la tirosina quinasa para uso como en la reivindicación 43, en donde en la PCR se separan los productos de amplificación utilizando diferencias de secuencia, usando un polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), electroforesis en gel sensible a la temperatura (TSGE), escisión química o polimorfismos del fragmento de restricción, o hibridación con una matriz de ácido nucleico.
- 45

Figura 1A y B



Figuras 2A - 2E

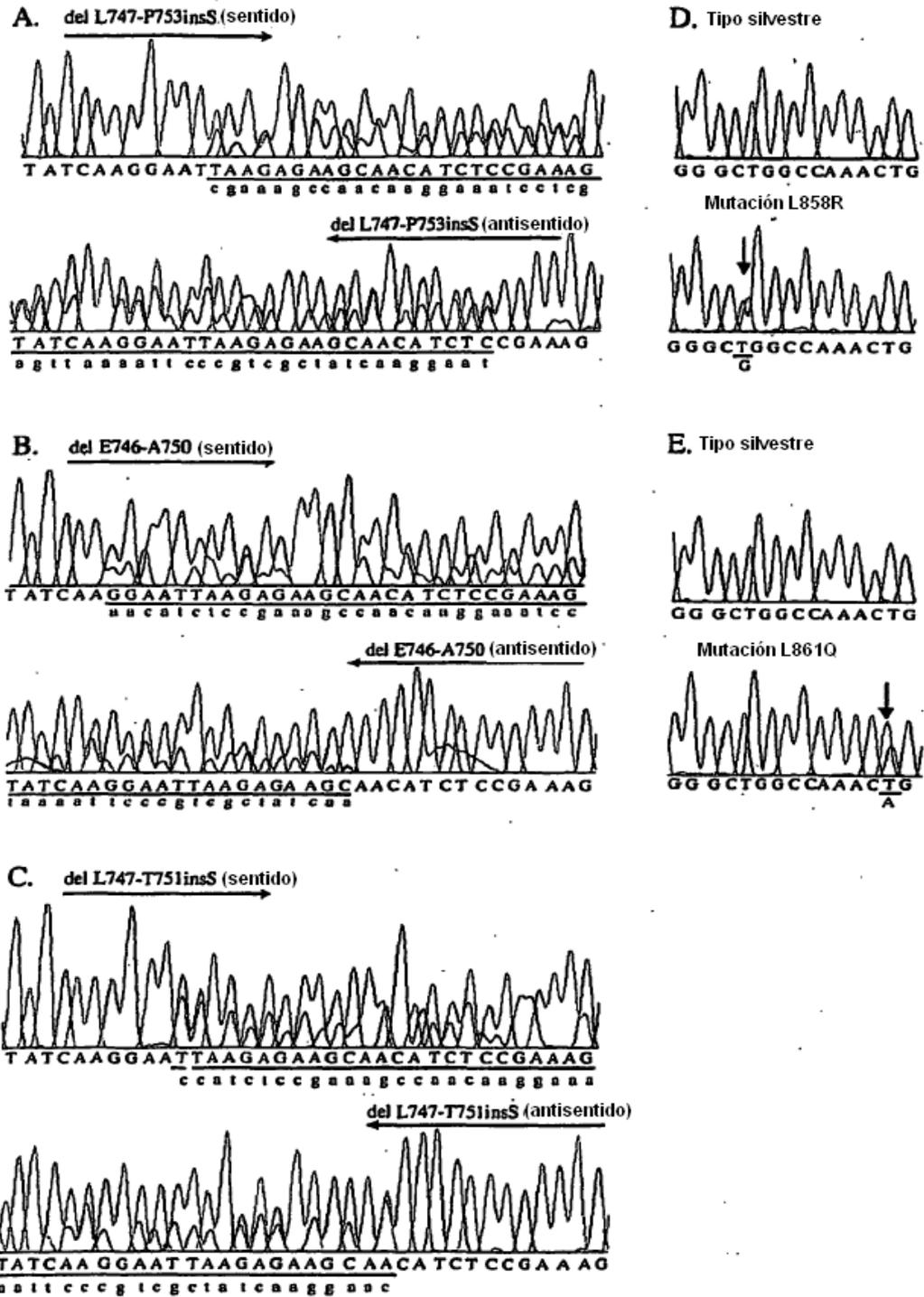
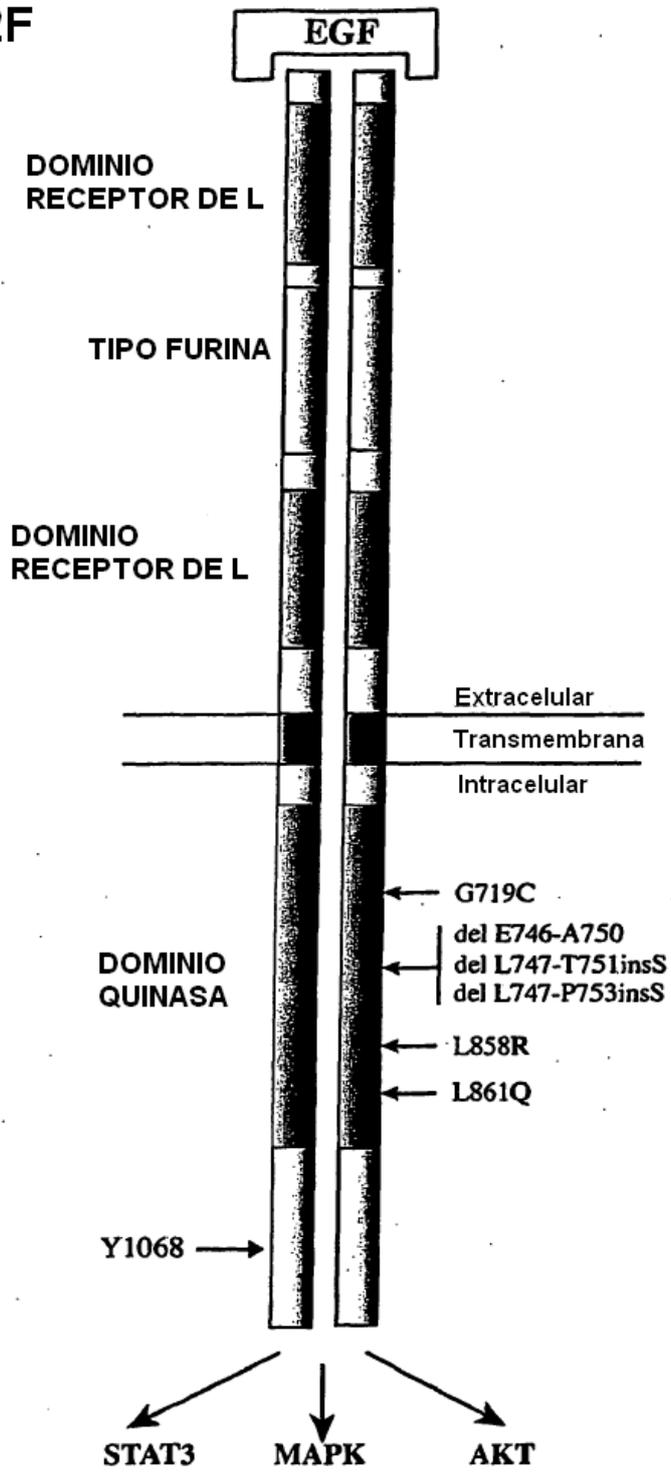
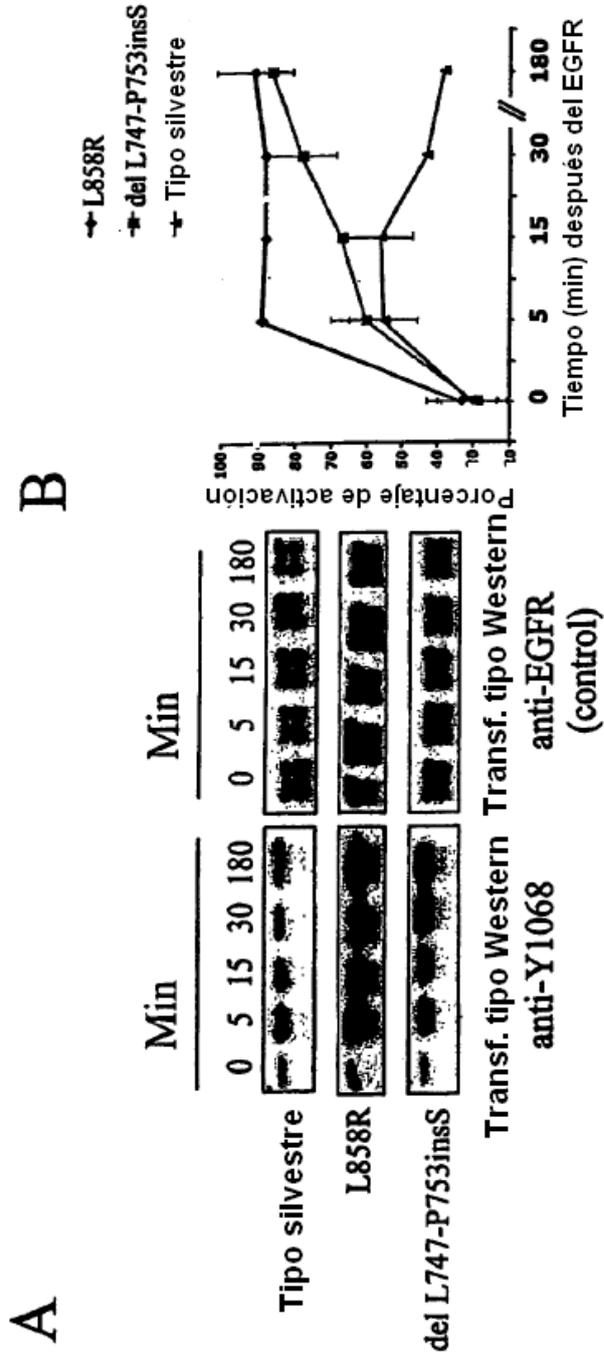


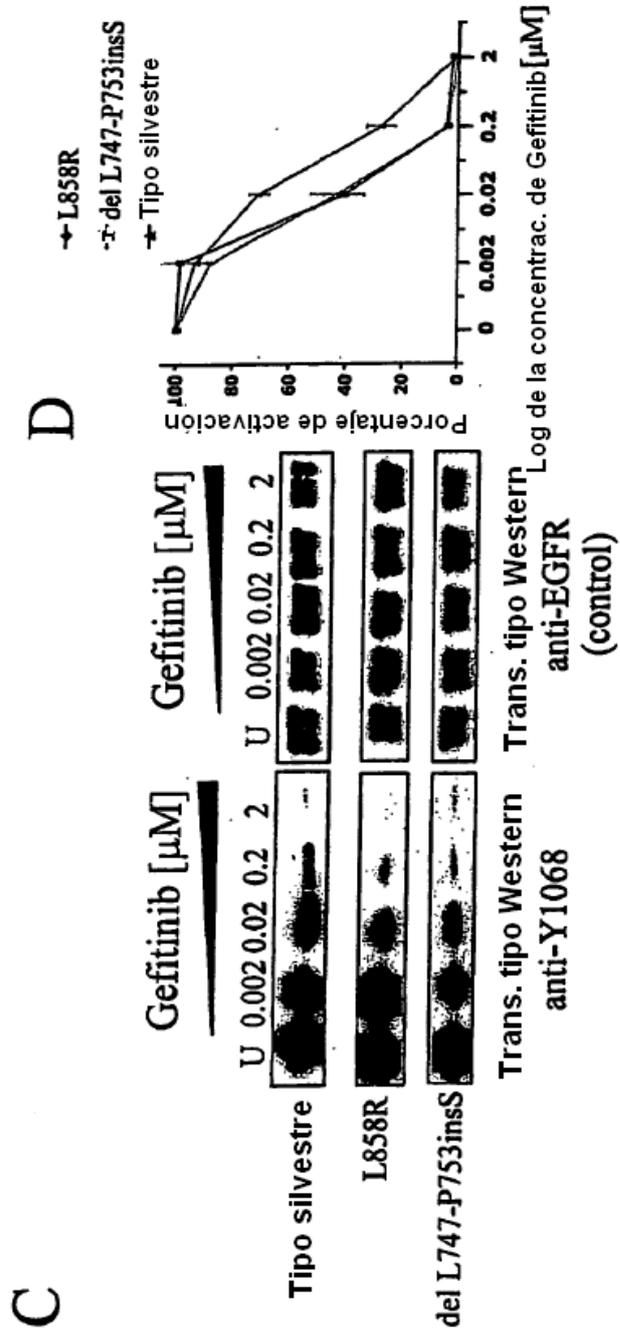
Figura 2F



Figuras 3A y 3B



Figuras 3C y 3D



4A	Gen EGFR	739	(SEQ. ID. NO. 509)	K I P V A I K E L R E A T S P K A N	756	856	(SEQ. ID. NO. 510)	F O L A K L L O	863
	Proteina EGFR	2215	(SEQ. ID. NO. 493)	A A A T T C C G G T C G C T A T C A A G G A A T T A A G A G A G C A G C A C A T C T C G A A G C C A A C	2268	2566	(SEQ. ID. NO. 494)	T T T G G C T G C C A A A C T C T C G G T	2589
Paciente									
→	Caso 1			A A A T T C C G G T C G C T A T C A A	21	25	A A C A T C T C G A A G C C A A C (SEQ. ID. NO. 495)	T T T G G C T G C C A A A C T C T C G G T	(SEQ. ID. NO. 491)
→	Caso 2			A A A T T C C G G T C G C T A T C A G G A A T	26	30	C A T C T C G A A G C C A A C (SEQ. ID. NO. 497)	T T T G G C T G C C A A A C T C T C G G T	(SEQ. ID. NO. 498)
→	Casos 3 & 4			A A A T T C C G G T C G C T A T C A G G A A T	26	35	C A A A G C C A A C (SEQ. ID. NO. 499)	T T T G G C T G C C A A A C T C T C G G T	(SEQ. ID. NO. 500)
→	Casos 5 & 6			A A A T T C C G G T C G C T A T C A G G A A T A G A G A A G C A A C A T C T C G A A G C C A A C	26	35	C A A A G C C A A C (SEQ. ID. NO. 501)	T T T G G C G C G C C A A A C T C T C G G T	(SEQ. ID. NO. 502)
→	Caso 7			A A A T T C C G G T C G C T A T C A G G A A T A G A G A A G C A A C A T C T C G A A G C C A A C	25	54	C A A A G C C A A C (SEQ. ID. NO. 503)	T T T G G C T G C C A A A C A G C T C G G T	(SEQ. ID. NO. 504)
			
									Exón 21
									Exón 19

Figuras 4B - C

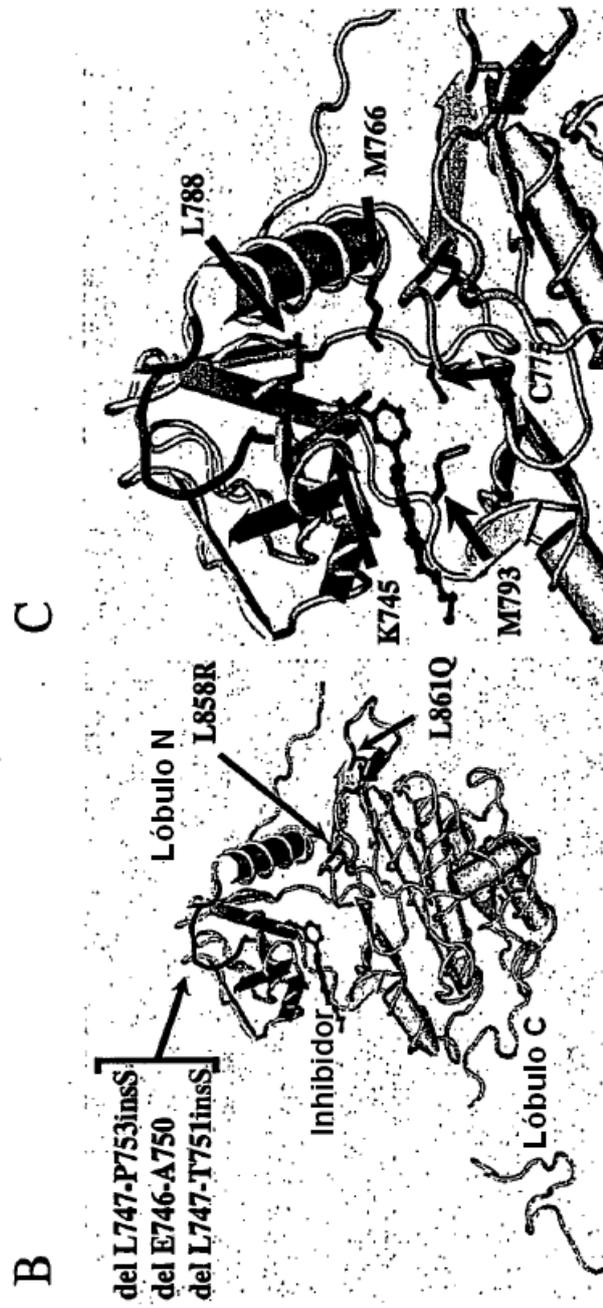


Figura 5

CCCGGCGCAGCGCGGCCGCGAGCAGCCTCCGCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGACGCGG -185

 CCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAGCTAGCCCCGGCGGCCCGCCCGCCAGACCGGACGACA -125

 GGCCACCTCGTCGGCGTCCGCCCCGAGTCCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGCG -65

 CACGGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATFGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCTCTTCGGGGAG -5

 CAGCGATGCGACCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCT 55
-M--R--P--S--G--T--A--G--A--A--L--L--A--L--L--A--A--L-- 18
 GCCCGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCA 115
 C--P--A--S--R--A--L--E--E--K--K--V--C--Q--G--T--S--N--K--L-- 38
 CGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCATTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTG 175
 T--Q--L--G--T--F--E--D--H--F--L--S--L--Q--R--M--F--N--N--C-- 58
 AGGTGGTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCT 235
 E--V--V--L--G--N--L--E--I--T--Y--V--Q--R--N--Y--D--L--S--F-- 78
 TAAAGACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAA 295
 L--K--T--I--Q--E--V--A--G--Y--V--L--I--A--L--N--T--V--E--R-- 98
 TTCCTTTGGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCTATGCCT 355
 I--P--L--E--N--L--Q--I--I--R--G--N--M--Y--Y--E--N--S--Y--A-- 118
 TAGCAGTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAACCGGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAA 415
 L--A--V--L--S--N--Y--D--A--N--K--T--G--L--K--E--L--P--M--R-- 138
 ATTTACAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTTCAGCAACAACCTGCCCTGTGCAACG 475
 N--L--Q--E--I--L--H--G--A--V--R--F--S--N--N--P--A--L--C--N-- 158
 TGGAGAGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTCGATGG 535
 V--E--S--I--Q--W--R--D--I--V--S--S--D--F--L--S--N--M--S--M-- 178
 ACTTCCAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGCT 595
 D--F--Q--N--H--L--G--S--C--Q--K--C--D--P--S--C--P--N--G--S-- 198
 GCTGGGGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAATCATCTGTGCCCGAGCAGT 655
 C--W--G--A--G--E--E--N--C--Q--K--L--T--K--I--I--C--A--Q--Q-- 218
 GCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCAG 715
 C--S--G--R--C--R--G--K--S--P--S--D--C--C--H--N--Q--C--A--A-- 238
 GCTGCACAGGCCCCCGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCGAGACGAAGCCA 775
 G--C--T--G--P--R--E--S--D--C--L--V--C--R--K--F--R--D--E--A-- 258
 CGTGCAAGGACACCTGCCCCCCACTCATGCTCTACAACCCACCACGTACCAGATGGATG 835
 T--C--K--D--T--C--P--P--L--M--L--Y--N--P--T--T--Y--Q--M--D-- 278
 TGAACCCCGAGGGCAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCCGTAATT 895
 V--N--P--E--G--K--Y--S--F--G--A--T--C--V--K--K--C--P--R--N-- 298

Figura 5 (continuación)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 5 (continuación)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 5 (continuación)

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

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

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

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

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

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

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

GGGTCGCGCCACAAAGCAGTGAATTTATTGGAGCATGA 3633 (SEQ ID NO 511)
R--V--A--P--Q--S--S--E--F--I--G--A--*- 1210 (SEQ ID NO 512)

FIG. 6

A		SEQ ID NO
	bucle de activación	
L858R	KTPQHVKI TDFG E AKLLGAEKEYH	870 477
EGFR	KTPQHVKI TDFGLAKLLGAEKEYH	870 478
BRAF	H E DLTVKIGD E GLAT V KSRWSGSHQ	608 479
	*** *****	
B		
	bucle P	
G719S	ETEFKKIKVL S SGAFGTVYKGLWIP	733 480
EGFR	ETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIP	733 481
BRAF	DGQITVGQRI S S FS F TVYK GKWHG	477 482
	*** ***** *	
C		
	742 750 752	
Del-1	VAIK --- T-SPKANKEILDEAYV	765 483
Del-2	VAIKELREAT- --- LDEAYV	765 484
Del-3	VAIKE --- PT-SPKANKEILDEAYV	765 485
Del-4	VAIKE --- -SKANKEILDEAYV	765 486
Del-5	VAIKV --- -PKANKEILDEAYV	765 487
EGFR	VAIKELREAT-SPKANKEILDEAYV	765 488
BRAF	VAVKMLNVTAPT P QQL Q AFKNEVG V	503 489
	** * * * *	

FIG. 7

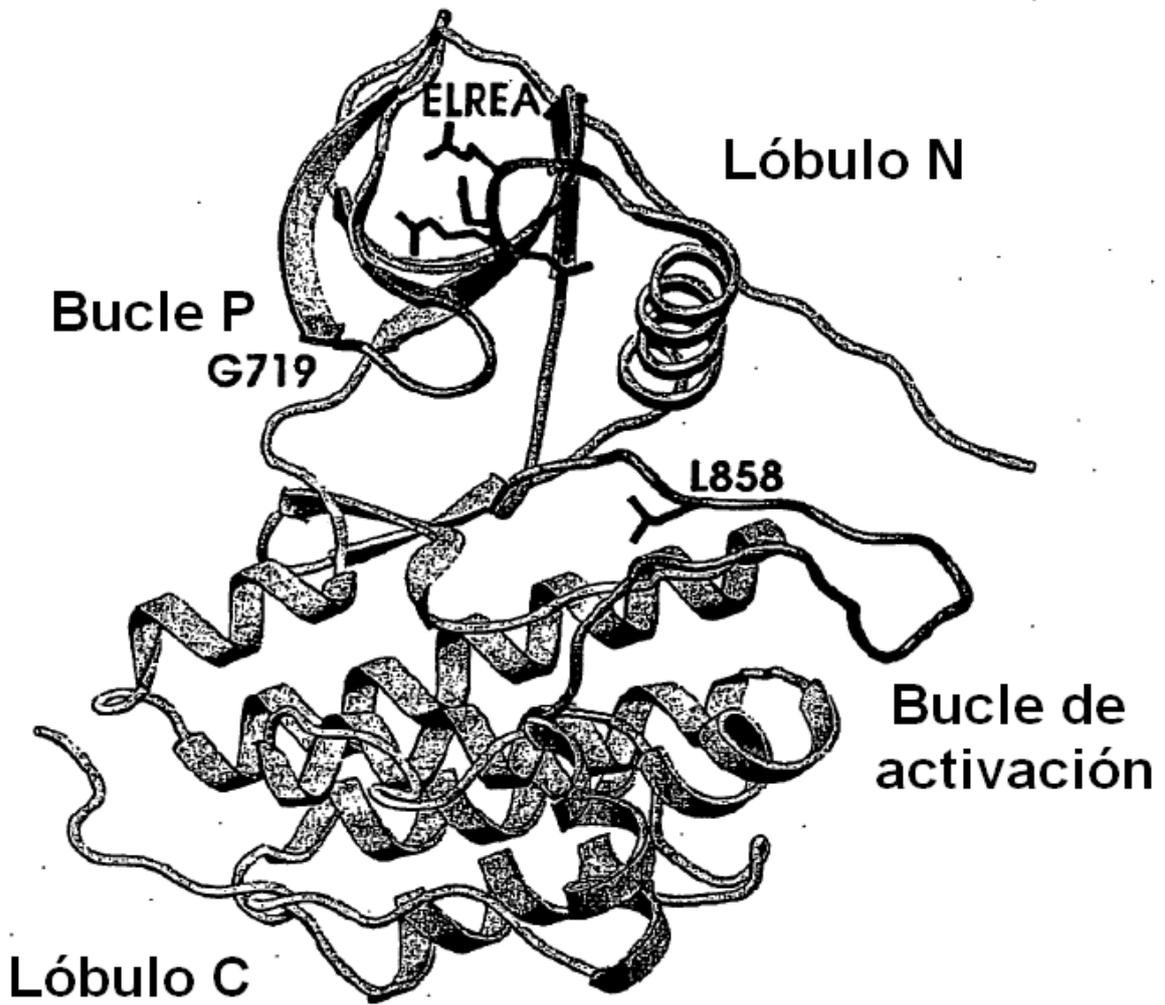


FIG. 8

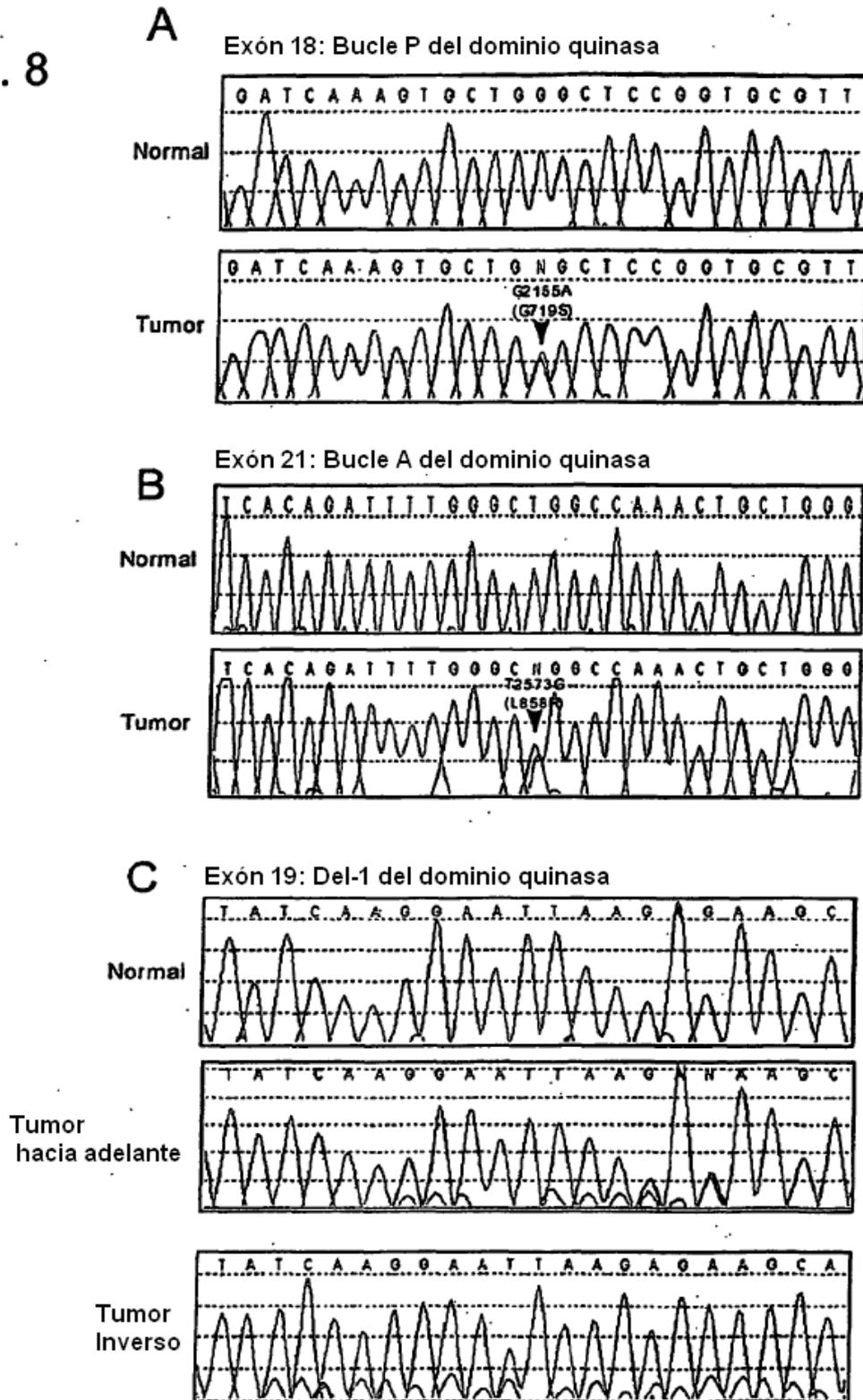


FIG. 8 (cont.)

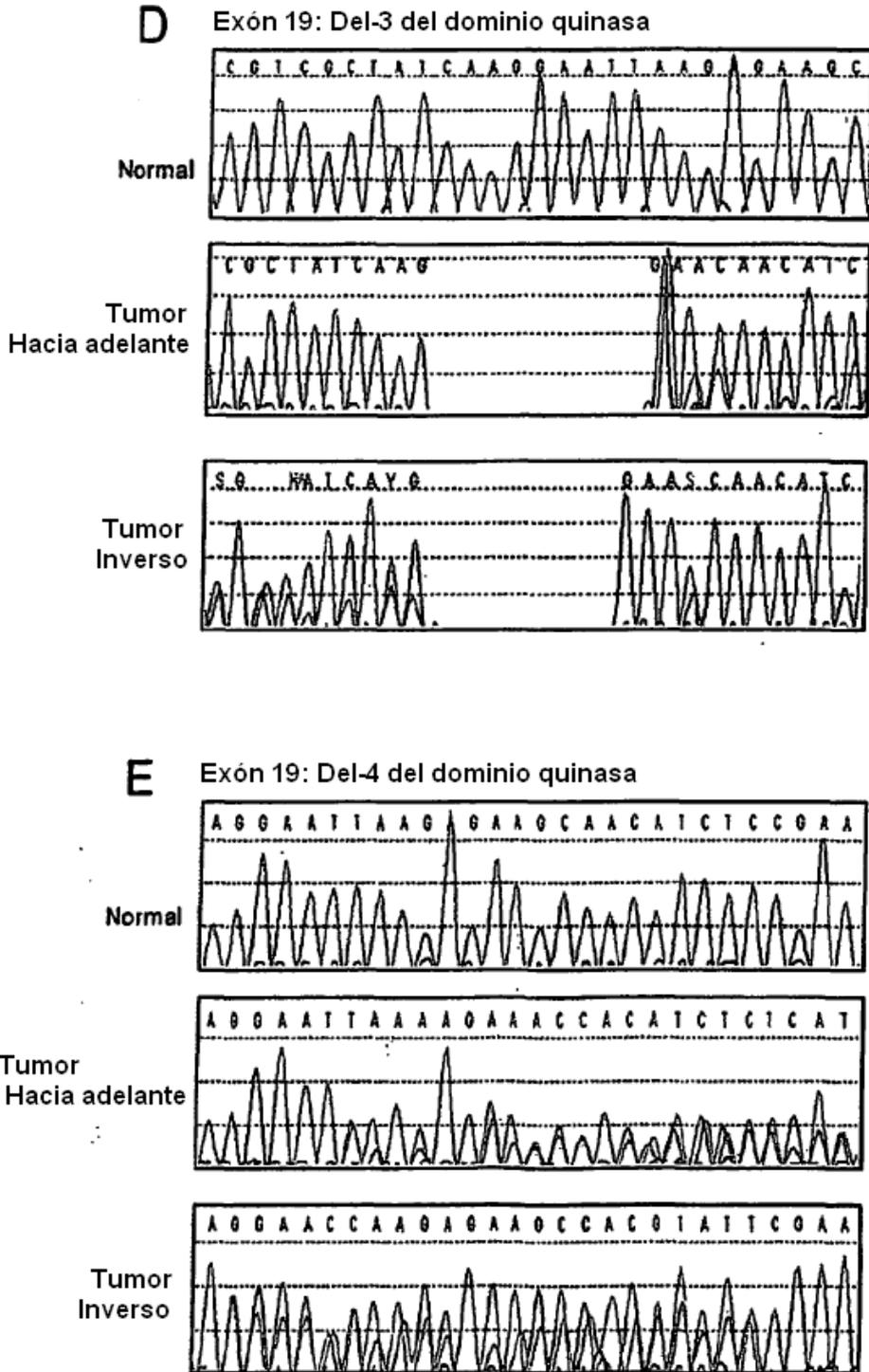


FIG. 8 (cont.)

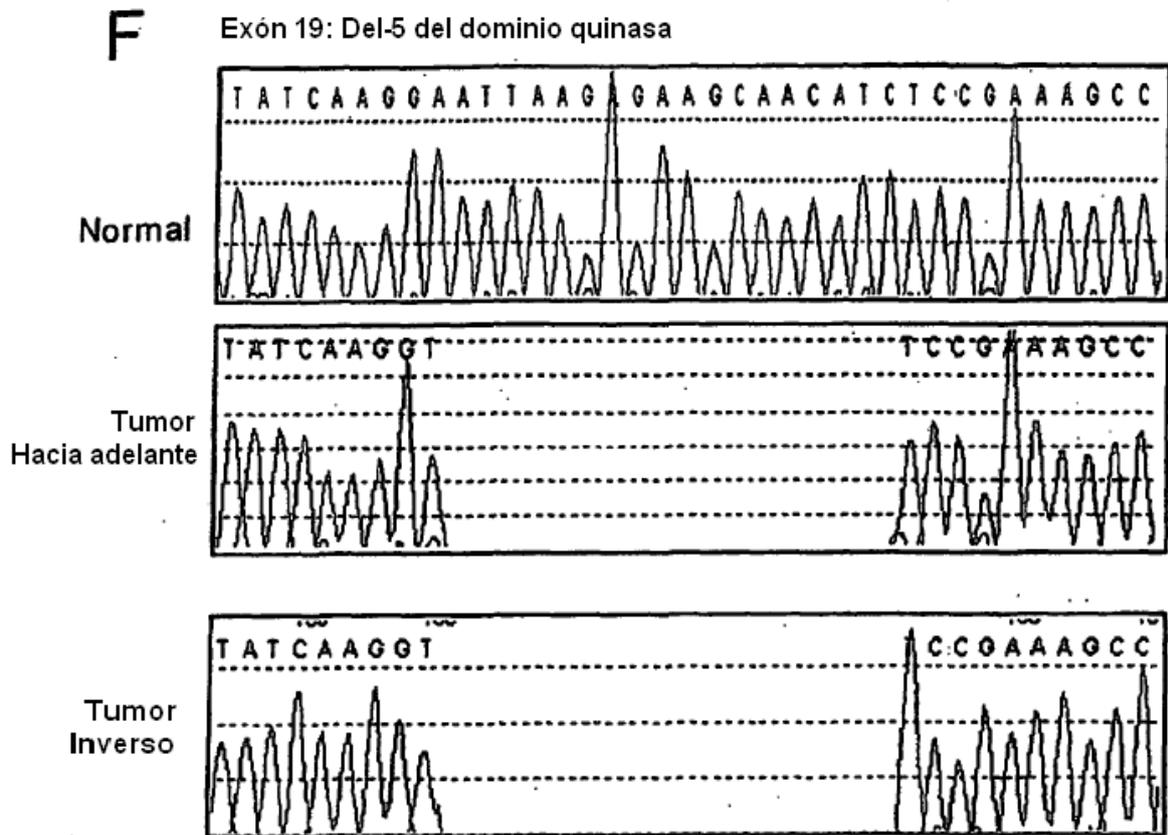
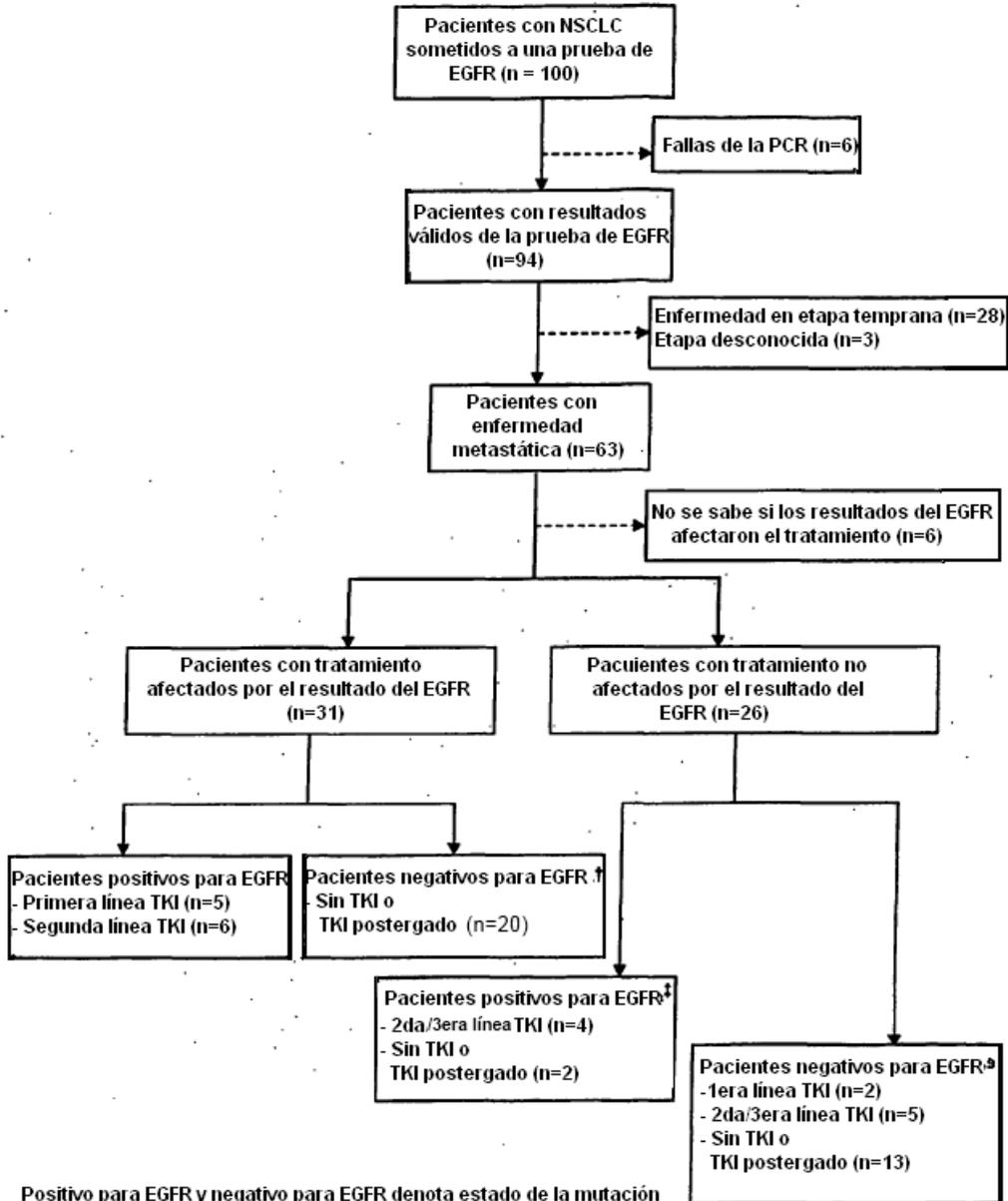


FIG 9
Alineación de Abl1 con EGFR

```

712          790
Ab11 (242) ITMKHKLGGGQYGEVYEGVWK----KSLTVAVKTLKEDT---MEVEEFLKEAAVMKEIKHPNVLVQLLGVCTREPPFFYIIT
EGFR (712) FKKIKVLGSGAFGVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYMASVDNPHVCRLLGICLTS-TVQLIIT
Consenso  LG G FG VY GLW   K I VAIK LKE T   E L EA VM I P L LLGIC   IIT
          791          869
Ab11 (316) EFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTA
EGFR (791) QLMPPGCLLDYVREHKDN-IGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPOHVKITDFGLAKLLGAEKEY
Consenso  M FG LLDYLRE N I A LL   QIA AM YLE K IHRDLAARN LV   VKI DFGLAKLL AD
          870          949
Ab11 (396) HA-GAKFPIKWTAPESLAXNKFISKSDVWAFGLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEGCEKVVYELMRA
EGFR (870) HAEGGKVPKWMMALESILHRYTHQSDVMSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICITIDVYMIMVK
Consenso  HA GAK PIKW A ESI H FS SDVWAFGV LWEI TFG PY GI S I ILEK RL P C   VY IM
          950          979
Ab11 (475) CWQWNPDRPSPFAEIHQAF----- (SEQ ID NO 491)
EGFR (950) CWMIDADSRPKFRELIIEFSKWARDPQRYL (SEQ ID NO 492)
Consenso. CW   RP F EI   F
    
```

Figura 10: El proceso de toma de decisión para pacientes con NSCLC metastático que son sometidos a una prueba de EGFR



Positivo para EGFR y negativo para EGFR denota estado de la mutación

^ 2 pacientes inscritos en un ensayo clínico de 1era línea de TKI

† 2 pacientes que reciben TKI antes del ensayo

‡ 3 pacientes que reciben TKI antes del ensayo

§ 1 paciente inscrito en un ensayo clínico de 1era línea de TKI y 4 pacientes que reciben TKI antes del ensayo

