

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 665**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2010 E 10841723 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2519825**

54 Título: **Detección simultánea de estado mutacional y número de copia génica**

30 Prioridad:

31.12.2009 US 291444 P

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

27.04.2015

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**SINGH, SHALINI;
NITTA, HIRO;
GAIRE, FABIEN y
DEL VALLE, EDMUNDO DAVID**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 534 665 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

Detección simultánea de estado mutacional y número de copia génica

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y métodos para detectar simultáneamente el estado mutacional y el número de copia génica. En particular, la presente invención proporciona la medición simultánea del número de copia del gen *RFCE* y la detección de las mutaciones por delección L858R y del exón 19 del gen *RFCE* en una muestra de tejido.

ANTECEDENTES

El reconocimiento de que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE) es una diana terapéutica en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y en otros cánceres ha llevado al desarrollo de inhibidores de molécula pequeña del receptor de tirosina quinasa como tratamientos del cáncer. Algunos ensayos clínicos han establecido que los inhibidores de tirosina quinasa del RFCE producen respuestas objetivas en sólo una minoría de pacientes de CPCNP. Se ha establecido que existe una correlación significativa entre el número de copia del gen *RFCE* y la presencia de determinadas mutaciones del gen *RFCE*, respecto a la sensibilidad de diversas líneas de CPCNP frente a inhibidores de tirosina quinasa de RFCE (Helfrich *et al.*, Clin. Cancer Res. 12(23):7117, 2006). Se ha demostrado que la amplificación de copias del gen *RFCE* se distribuye en focos en los especímenes de cáncer de pulmón, mayoritariamente en regiones con histología sólida y que los pacientes con amplificación de *RFCE* presentan resultados significativamente peores (Sholl *et al.*, Cancer Res. 69(21), 2009). Los adenocarcinomas pulmonares con amplificación del gen *RFCE* y las delecciones y mutaciones de *RFCE* específicas muestran características clinicopatológicas claras asociadas a un pronóstico significativamente peor.

Se han desarrollado métodos que resultan útiles en la detección de mutaciones de RFCE en tejidos humanos (Yu *et al.*, Clin. Cancer Res. 15(9):3023, 2009). En la actualidad el campo no dispone de métodos para la detección simultánea del número de copia del gen RFCE y el estado mutacional de RFCE en múltiples loci. Dichos métodos proporcionarían un avance significativo en el diagnóstico de cánceres asociados al RFCE y en la determinación de regímenes de tratamiento eficaces en los pacientes de cáncer. Se requieren tecnologías adicionales para satisfacer estas deficiencias y otras en el campo.

Carlynn Willmore-Payne *et al.* (Human Pathology, 2006) y Allan R. Li *et al.* (Journal of Molecular Diagnostics, 2008) describen la detección del estado de RFCE en muestras de tejidos de pacientes de cáncer.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y métodos para detectar simultáneamente el estado mutacional y el número de copia génica. En particular, la presente invención proporciona la medición simultánea del número de copia del gen *RFCE* y la detección de las mutaciones L858R y Exón 19 del gen *RFCE* en muestras de tejido, por ejemplo de un paciente de cáncer.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para evaluar el estado de RFCE de una muestra de tejido según se define en las reivindicaciones 1 a 15.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un kit según se define en la reivindicación 16.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra la detección concurrente mediante IHQ específica de mutante L585R (rojo), IHQ específica de exón 19 del (azul) e HIS del gen *RFCE* (negro) de (A) *RFCE* de tipo salvaje, (B) *RFCE* exón 19 del, y (C) *RFCE* L585R.

La figura 2 demuestra la apariencia similar de una señal de hibridación *in situ* con plata y un pigmento antracótico.

La figura 3 muestra la detección concurrente mediante IHQ específica de mutante L585R (azul), IHQ específica de exón 19 (dorado) e HIS del gen *RFCE* (rojo) de (A) *RFCE* de tipo salvaje, (B) *RFCE* exón 19 del, y (C) *RFCE* L585R. La figura 4 demuestra una apariencia similar de la detección inmunohistoquímica roja y la detección mediante hibridación *in situ* roja.

La figura 5 muestra la detección concurrente mediante IHQ específica de mutante L585R (roja), IHQ específica de exón 19 (dorado) e HIS del gen *RFCE* (azul) de (A) *RFCE* de tipo salvaje, (B) *RFCE* exón 19 del, y (C) *RFCE* L585R. La figura 6 muestra la detección concurrente mediante IHQ específica de mutante L585R (rojo), IHQ específica de exón 19 (dorado) e HIS del gen *RFCE* (azul) de (A) *RFCE* mutante negativo, (B) *RFCE* exón 19 del, y (C) *RFCE* L585R.

La figura 7 demuestra una apariencia similar de la detección inmunohistoquímica roja (A) y la detección inmunohistoquímica dorada (B).

La figura 8 muestra la detección concurrente de IHQ específica de mutante L585R e IHQ específica de exón 19 del (azul) e HIS del gen *RFCE* (rojo) de (A) *RFCE* de tipo salvaje, (B) *RFCE* exón 19 del, y (C) *RFCE* L585R.

La figura 9 muestra una comparación entre la detección de proteínas de IHQ (A) y la detección dual génica/de proteínas (B).

5 La figura 10 muestra una comparación entre la detección de proteínas de IHQ (A) y la detección dual génica/de proteínas (B).

La figura 11 muestra una comparación entre la detección de proteínas de IHQ (A) y la detección dual génica/de proteínas (B).

10 La figura 12 muestra una comparación entre la detección de proteínas de IHQ (A) y la detección dual génica/de proteínas (B).

La figura 13 muestra una comparación entre la detección de proteínas de IHQ (A) y la detección dual génica/de proteínas (B).

15 La figura 14 muestra la detección concurrente de genes/proteínas mediante IHQ específica de mutante L585R y específica de exón 19 del (azul) e HIS del gen *RFCE* (rojo) de (A) *RFCE* negativo para mutación, (B) *RFCE* levemente positiva para mutación, y (C) *RFCE* positivo para mutación.

La figura 15 muestra heterogeneidad tumoral utilizando la detección concurrente de genes/proteínas mediante IHQ específica para mutante L585R y específica para exón 19 del (azul) e HIS del gen *RFCE* (rojo).

20 La figura 16 muestra heterogeneidad tumoral utilizando la detección concurrente de genes/proteínas mediante IHQ específica para mutante L585R y específica para exón 19 del (azul) e HIS del gen *RFCE* (rojo).

DEFINICIONES

Con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención, se definen varios términos y expresiones a continuación.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "número de copia" o "número de copia génica" tal como se utiliza en referencia a secuencias específicas de ácidos nucleicos (por ejemplo *RFCE*, *RFCE* de tipo salvaje, *RFCE* exón 19 del, *RFCE* L858R y de control) se refiere al número real de dichas secuencias por cada célula individual. Pude informarse del número de copia por cada célula individual o informarse como el número medio en un grupo de células (por ejemplo una muestra de tejido). Al comparar el "número de copia" de las células (por ejemplo células experimentales y de control), no resulta necesario determinar el número de copia exacto de la célula, sino por el contrario sólo se requiere obtener una aproximación que permita determinar si una célula dada contiene más o menos de la secuencia de ácidos nucleicos en comparación con otra célula. De esta manera, cualquier método capaz de determinar directa o indirectamente de manera fiable las cantidades de ácidos nucleicos puede utilizarse para medir el número de copia aunque no se determine el número de copia real.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "amplificación" utilizado en referencia al número de copia se refiere a la condición en la que el número de copia de una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo *RFCE*, *RFCE* de tipo salvaje, *RFCE* exón 19 del, *RFCE* L858R) es superior al número de copia de una secuencia de control (por ejemplo el cromosoma 17). En otras palabras, la amplificación indica que la proporción entre una secuencia particular de ácidos nucleicos (por ejemplo *RFCE*, *RFCE* de tipo salvaje, *RFCE* exón 19 del, *RFCE* L858R) es superior a 1:1 en comparación con una secuencia de control (por ejemplo 1,1:1, 1,2:1 o 1,3:1). En realizaciones preferentes, la proporción de una secuencia particular de ácidos nucleicos es por lo menos 1,5 veces superior al número de copia de la secuencia de control (es decir, 1,5:1).

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "molécula de ácidos nucleicos" y "secuencia de ácidos nucleicos" se refieren a cualquier molécula que contiene ácidos nucleicos, incluyendo, aunque sin limitación, ADN o ARN. Las expresiones comprenden secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN, incluyendo, aunque sin limitación, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-tio-N6-isopenteniladenina, metil-éster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metil-éster de ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hibridación" se utiliza en referencia al emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y fuerza de hibridación (por ejemplo la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) resulta impactada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la astringencia de las condiciones, la T_m del híbrido formado y la proporción G:C dentro de los ácidos nucleicos.

65 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos) o una biblioteca de fragmentos de nucleótidos, sea naturales, tal como en un digerido de

restricción purificado, como producidos sintética o recombinantemente o mediante amplificación (por ejemplo mediante PCR), que es capaz de hibridarse con un oligonucleótido de interés. Las sondas útiles en la presente invención pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. Las sondas resultan útiles para la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas particulares (por ejemplo RFCE, RFCE de tipo salvaje, RFCE exón 19 del, RFCE L858R). Se encuentra contemplado que cualquier sonda utilizada en la presente invención pueda marcarse con cualquier "molécula informadora" o sustrato detectable, de manera que resulte detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, aunque sin limitación, los sistemas enzimáticas (por ejemplo ELISA, así como los ensayos inmunohistoquímicos basados en enzimas), fluorescentes (por ejemplo FISH), cromogénicos (por ejemplo CISH), radioactivos, espectrometría de masas y luminiscentes. No se pretende que la presente invención se encuentre limitada a cualquier sistema de detección o marcaje particular.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "marcaje" se refiere a cualquier molécula que pueda ser detectada. Por ejemplo, entre los marcajes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{35}S , biotina, digoxigenina (DIG), dinitrofenol (DNP), avidina, y moléculas cromogénicas, fluorescentes o enzimáticas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "hibridación *in situ*" e "ISH" se refiere a métodos para detectar y localizar los ácidos nucleicos dentro de una preparación de células o tejidos. Estos métodos proporcionan información tanto cuantitativa como espacial sobre las secuencias de ácidos nucleicos dentro de una célula o cromosoma individual. Se ha utilizado comúnmente ISH en muchas áreas, incluyendo el diagnóstico prenatal de trastornos genéticos, citogenética molecular, la detección de la expresión o sobreexpresión génica, la identificación de sitios de expresión génica, el mapeado de genes, la localización de genes diana y la identificación de diversas infecciones víricas y microbianas, el diagnóstico tumoral, el análisis de fertilización *in vitro*, el análisis del trasplante de médula ósea y el análisis cromosómico. La técnica generalmente implica la utilización de sondas de ácidos nucleicos marcadas que se hibridan con un cromosoma o ARNm en células que se montan sobre una superficie (por ejemplo portaobjetos u otro material). Las sondas pueden marcarse con moléculas fluorescentes, pigmentos u otros marcajes. Un ejemplo de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se proporciona en Kuo *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 49:112-119, 1991. Otros métodos de detección ISH y FISH se proporcionan en la patente US nº 5.750.340 de Kim *et al.* Un ejemplo de hibridación *in situ* cromogénica (CISH) se proporciona en la patente US nº 6.942.970 de Isola *et al.* Un ejemplo adicional de CISH es la hibridación *in situ* con plata (SISH), tal como se proporciona en las patentes US nº 6.670.113, nº 7.183.072, nº 7.364.484, nº 7.592.153, nº 7.632.652 y nº 7.642.064 y en las publicaciones de patente US nº 2007/0224625 y nº 2008/0213783. El experto en la materia conocerá protocolos adicionales.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "bajo condiciones de hibridación *in situ*" se refiere a cualquier conjunto de condiciones utilizado para llevar a cabo la hibridación *in situ* (ISH) que permite la detección con éxito de sondas de oligonucleótidos marcados. Generalmente, las condiciones utilizadas para la hibridación *in situ* implican la fijación de muestra de tejido u otra muestra biológica sobre una superficie, el tratamiento prehibridación para incrementar la accesibilidad de las secuencias de ácidos nucleicos diana en la muestra (y para reducir la unión no específica), la hibridación de las sondas de ácidos nucleicos marcadas con el ácido nucleico diana, lavados post-hibridación para eliminar sonda no unida y la detección de las sondas hibridadas. Cada una de estas etapas es bien conocida de la técnica y se ha llevado a cabo bajo muchas condiciones experimentales diferentes. Nuevamente, se proporcionan ejemplos de dichas condiciones de hibridación *in situ* en Kuo *et al.*, patente US nº 5.750.340 y en la patente US nº 6.942.970 de Isola *et al.* Se proporcionan posteriormente ejemplos adicionales de condiciones y reactivos.

La muestra de tejido o biológica puede fijarse a una superficie utilizando fijadores. Los fijadores preferentes causan la fijación de los constituyentes celulares mediante una acción de precipitación que es reversible, mantiene una morfología celular con el ácido nucleico en la localización celular apropiada y no interfiere con la hibridación de los ácidos nucleicos. Entre los ejemplos de fijadores se incluyen, aunque sin limitación, formaldehído, alcoholes, soluciones salinas, cloruro mercúrico, cloruro sódico, sulfato sódico, dicromato potásico, fosfato potásico, bromuro amónico, cloruro de calcio, acetato sódico, cloruro de litio, acetato de cesio, acetato de calcio o magnesio, nitrato potásico, dicromato potásico, cromato sódico, yoduro potásico, yodato sódico, tiosulfato sódico, ácido pícrico, ácido acético, hidróxido sódico, acetonas, cloroformo, glicerina y timol.

Tras la fijación en una superficie, las muestras se tratan para eliminar las proteínas y otro material celular que podría causar unión de fondo no específica. Entre los agentes que eliminan proteínas se incluyen, aunque sin limitación, enzimas tales como la pronasa y la proteinasa K, o ácidos suaves, tales como HCl 0,02-0,2 N, así como ARNasa (para eliminar el ARN).

El ADN sobre la superficie se desnaturaliza de manera que puedan unirse las sondas oligonucleótidas. La desnaturalización puede llevarse a cabo modificando, por ejemplo, el pH, incrementando la temperatura, o con solventes orgánicos tales como la formamida. A continuación, la sonda marcada puede hibridarse con el ADN desnaturalizado bajo condiciones de hibridación estándares. La muestra de tejido o biológica puede depositarse sobre una superficie sólida utilizando técnicas estándares tales como el corte de secciones de tejidos o la preparación de frotis o la citocentrifugación de suspensiones de células individuales. Entre los ejemplos de superficies sólidas se incluyen, aunque sin limitación, vidrio, nitrocelulosa, cinta adhesiva, nilón o Gene Screen Plus.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "agente anticáncer", "agente anticáncer convencional" o "fármaco terapéutico del cáncer" se refieren a cualesquiera agentes terapéuticos (por ejemplo compuestos quimioterapéuticos y/o compuestos terapéuticos moleculares), terapias de radiación o intervenciones quirúrgicas, utilizadas en el tratamiento del cáncer (por ejemplo en mamíferos, en primates, en seres humanos, etc.).

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "fármaco" y "agente quimioterapéutico" se refieren a moléculas farmacológicamente activas que se utilizan para diagnosticar, tratar o prevenir enfermedades o condiciones patológicas en un sistema fisiológico (por ejemplo un sujeto, o células *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*, tejidos y órganos). Los fármacos actúan alterando la fisiología de un organismo vivo, tejido, célula o sistema *in vitro* en el que se ha administrado el fármaco. Se pretende que las expresiones "fármaco" y "agente quimioterapéutico" comprendan compuestos antihiperproliferativos y antineoplásicos, así como otros compuestos biológicamente terapéuticos.

10 Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para proporcionar efectos beneficiosos o deseados. Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "administración" se refiere al acto de proporcionar un fármaco, profármaco, anticuerpo u otro agente, o el tratamiento terapéutico en un sistema fisiológico (por ejemplo un sujeto o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*). Las vías de administración ejemplares en el cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalante) mucosa oral (bucal), oído, mediante inyección (por ejemplo por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, etc.) y similares.

20 La "coadministración" se refiere a la administración de más de un agente químico o tratamiento terapéutico (por ejemplo terapia de radiación) en un sistema fisiológico (por ejemplo un sujeto o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*). La "coadministración" de los agentes químicos respectivos puede ser concurrente o en cualquier orden temporal o combinación física. La "coadministración" de terapias es un curso de acción de tratamiento que se utiliza para muchos tipos de cáncer.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a organismos sometidos a las composiciones y métodos de la presente invención. Entre dichos organismos se incluyen aunque sin limitación, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos, cerdos, vacas, ovejas, cabras, ratones, ratas y similares. En algunas realizaciones, pueden obtenerse muestras de tejido, órganos, líquidos (por ejemplo sangre, orina, saliva, etc.) de un "sujeto" y utilizarse conjuntamente con la presente invención.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" generalmente se refiere a un sujeto que recibirá o que ha recibido tratamiento para una enfermedad o condición o que está siendo cribado para una enfermedad o condición.

35 El término "diagnosticado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la identificación de una enfermedad por sus signos o síntomas o análisis genético, análisis patológico, análisis histológico y similar. Un sujeto o paciente es "diagnosticado" de cáncer en el caso de que se identifique cáncer en un sujeto mediante cualesquiera medios adecuados. Un sujeto "diagnosticado" de cáncer puede mostrar o no cualesquiera signos o síntomas del cáncer.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "sujeto que se sospecha que presenta cáncer" es cualquier sujeto o paciente que está siendo analizado o sometido a ensayo mediante cualquier método adecuado, para la presencia de cáncer, células de cáncer, tumores, células precancerosas, etc. El sujeto puede presentar o no factores de riesgo de cáncer, y puede mostrar o no cualesquiera signos o síntomas de cáncer.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "sujeto que sufre de cáncer" es cualquier sujeto o paciente que manifiesta signos o síntomas de cáncer. Un "sujeto que sufre de cáncer" puede haber recibido o no algún ensayo de cáncer, o puede haber recibido o no un diagnóstico de cáncer.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proteína de unión a antígeno" se refiere a proteínas que se unen a un antígeno específico. Entre las "proteínas de unión a antígeno" se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, inmunoglobulinas, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y bibliotecas de expresión de Fab. Se utilizan diversos procedimientos conocidos de la técnica para la producción de los anticuerpos policlonales. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales huésped mediante la inyección con el péptido correspondiente al epítipo deseado, incluyendo, aunque sin limitación, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. En una realización preferente, se conjuga el péptido con un portador inmunogénico (por ejemplo toxoide diférico, albúmina de suero bovino (ASB) o hemocianina de lapa americana (HLA)). Se utilizan diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, aunque sin limitación, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas en superficie tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceites, hemocianinas de lapa

americana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (Bacille Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

5 Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede utilizarse cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Köhler y Milstein (Köhler y Milstein, *Nature* 256:495-497, 1975), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (ver, por ejemplo, Kozbor *et al.*, *Immunol. Today* 4:72, 1983) y la técnica del hibridoma del VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77 a 10 96, 1985).

15 Según la técnica, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente US nº 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos según se desee. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas conocidas de la técnica para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281, 1989) para permitir la identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

20 Los fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo (región de unión a antígeno) de la molécula de anticuerpo pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, entre dichos fragmentos se incluyen, aunque sin limitación, el fragmento F(ab')₂, que puede producirse mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo, los fragmentos Fab' que pueden generarse mediante la reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂ y los fragmentos Fab que pueden generarse mediante tratamiento de una molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

25 Los genes codificantes de las proteínas de unión a antígeno pueden aislarse mediante métodos conocidos de la técnica. En la producción de anticuerpos puede llevarse a cabo el cribado para el anticuerpo deseado mediante técnicas conocidas (por ejemplo radioinmunoensayo, ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina de difusión en gel, 30 ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (utilizando oro coloidal, marcajes enzimáticos o de isótopos radioactivos, por ejemplo), transferencias western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación, etc.), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.), etc.

35 El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, con la condición de que se unan específicamente a un antígeno diana.

40 La expresión "anticuerpo primario" en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a la proteína antígeno diana en una muestra de tejido. Un anticuerpo primario es generalmente el primer anticuerpo utilizado en un procedimiento inmunohistoquímico. En una realización, el anticuerpo primario es el único anticuerpo utilizando en un procedimiento IHQ. Con respecto a ISH, un anticuerpo primario típicamente se dirige a un marcaje, en el que dicho marcaje (por ejemplo un hapteno, etc.) se incorpora en una sonda oligonucleótida dirigida a una secuencia diana. Por ejemplo, en el caso de que una sonda oligonucleótida se marque con DIG, el anticuerpo 45 primario es un anticuerpo anti-DIG que reconoce y se une al hapteno DIG del oligonucleótido. Además, dicho anticuerpo primario utilizado en ISH típicamente se conjuga con un reactivo o enzima de detección que proporciona un medio de detección para detectar sucesos de hibridación.

50 La expresión "anticuerpo secundario" se refiere en la presente memoria a un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo primario, formando de esta manera un puente entre el anticuerpo primario y un reactivo posterior, si lo hubiere. El anticuerpo secundario generalmente es el segundo anticuerpo utilizando en un procedimiento inmunohistoquímico.

55 El término "tinción" utilizado como nombre o la expresión "reactivo de tinción" se refiere a compuestos biológicos o químicos, y composiciones que contienen dichos compuestos que, aplicados en moléculas diana en la muestra biológica, provocan que las moléculas sean detectables (por ejemplo bajo examen microscópico). Entre las tinciones se incluyen, aunque sin limitación, sondas de ácidos nucleicos detectables, anticuerpos y otros reactivos que, en combinación o por sí mismos, resultan en un producto final de color. El término "tinción" se utiliza 60 intercambiamente con el término "pigmento". El término "tinción" utilizado como verbo o la expresión "realizando una tinción" se refiere a la puesta en contacto de un reactivo de tinción, tinción o pigmento con una muestra biológica.

65 Tal como se utiliza en la presente memoria, "muestra de tejido" pretende referirse a una colección de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente, preferentemente que contiene material genético y/o cromosómico. Los cuatro tejidos humanos principales son: (1) epitelio, (2) los tejidos conectivos, incluyendo vasos sanguíneos, hueso y cartílago, (3) tejido muscular, y (4) tejido nervioso. La fuente de la muestra de tejido puede ser

tejido sólido, tal como una muestra de órgano o tejido fresca, congelada y/o conservada o biopsia o aspirado; sangre o cualesquiera constituyentes sanguíneos; líquidos corporales tales como líquido cerebroespinal, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido puede ser también células o líneas celulares primarias o en cultivo. La muestra de tejido puede contener compuestos que no se encuentran naturalmente entremezclados con el tejido en estado natural, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

Para los fines de la presente memoria, una "sección" de una muestra de tejido es una única parte o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo una sección delgada de tejido o células cortadas de una muestra de tejido. Se entiende que pueden obtenerse múltiples secciones de muestras de tejido y someterse a análisis según la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos y kits para detectar simultáneamente el estado mutacional y el número de copia génica según se define en las reivindicaciones 1 a 16. En particular, la presente invención proporciona la medición simultánea del número de copia génica, el estado de la mutación L858R y el estado de la mutación exón 19 del en las muestras de tejido procedentes de un paciente. La información derivada de estas mediciones seguidamente puede utilizarse para realizar un diagnóstico y/o pronóstico para el paciente y para determinar un tratamiento terapéutico para el paciente.

1. Reactivos

Los métodos y kits según las reivindicaciones 1 a 16 de la presente invención utilizan una diversidad de reactivos, incluyendo, aunque sin limitación, moléculas de unión a antígeno, sondas de ácidos nucleicos, fracciones detectables, fracciones generadoras de señal y sistemas generadores de señal. Estos reactivos se utilizan para generar señales detectables de manera que puede detectarse la presencia o la ausencia de mutaciones de *RFCE* y la amplificación del gen *RFCE*.

Moléculas de unión a antígeno

En algunas realizaciones, la presente invención utiliza moléculas de unión a antígeno para detectar mutaciones de *RFCE*. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona reactivos para la detección específica de *RFCE* exón 19 del y/o *RFCE* L858R. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona proteínas de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos) específicos para *RFCE* exón 19 del. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona proteínas de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos) específicos para *RFCE* L858R. En algunas realizaciones, se detecta *RFCE* exón 19 del y *RFCE* L858R en una muestra (por ejemplo células, cultivo celular, muestra de tejido, muestra de tumor, etc.) utilizando reactivos (por ejemplo proteínas de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos) de la presente invención. En algunas realizaciones, se utilizan anticuerpos para detectar, identificar y/o cuantificar *RFCE* exón 19 del y/o *RFCE* L858R en una muestra de tejido de un sujeto que se sospecha que presenta cáncer, un sujeto diagnosticado de cáncer y/o un sujeto que sufre de cáncer. En algunas realizaciones, se detecta *RFCE* exón 19 del y *RFCE* L858R concurrentemente con otras formas (por ejemplo de tipo salvaje, mutante) de *RFCE*. En algunas realizaciones, *RFCE* exón 19 del y *RFCE* L858R se detectan concurrentemente con una o más referencias o estándares (por ejemplo otro gen, *RFCE* de tipo salvaje, etc.).

La presente exposición proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpo aislados contra *RFCE*, *RFCE* de tipo salvaje, *RFCE* exón 19 del, *RFCE* L858R y otras variantes de *RFCE*. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, puede ser cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal que reconozca específicamente dichas proteínas. En algunas realizaciones, la presente exposición proporciona anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, específicos para *RFCE*, *RFCE* de tipo salvaje, *RFCE* exón 19 del, *RFCE* L858R y otras variantes de *RFCE*. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos quiméricos o humanizados que se unen específicamente a dichas proteínas. En otras realizaciones, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos humanos que se unen específicamente a dichas proteínas.

Los anticuerpos contra *RFCE*, *RFCE* de tipo salvaje, *RFCE* exón 19 del, *RFCE* L858R y otras variantes de *RFCE* encuentran utilizada en los métodos experimentales, diagnósticos y terapéuticos descritos en la presente memoria. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente exposición se utilizan para detectar la expresión de *RFCE*, *RFCE* de tipo salvaje, *RFCE* exón 19 del, *RFCE* L858R y otras variantes de *RFCE* en muestras biológicas, tales como, por ejemplo, una biopsia de tejido o muestra de sangre de un paciente.

En algunas realizaciones preferentes, los anticuerpos específicos para las mutaciones de *RFCE* se obtienen de Cell Signaling Technologies, Danvers, MA. En general, pueden prepararse anticuerpos policlonales mediante cualquier método conocido. Los anticuerpos policlonales pueden generarse mediante inmunización de un animal (por ejemplo un conejo, rata, ratón, burro, etc.) mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (un fragmento peptídico purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc.)

(por ejemplo RFCE, RFCE de tipo salvaje, RFCE exón 19 del, RFCE L858R y otras variantes de RFCE) opcionalmente conjugado con hemocianina de lapa americana (HLA), albúmina sérica, etc. diluida en solución salina estéril y combinada con un adyuvante (por ejemplo adyuvante de Freund completo o incompleto) para formar una emulsión estable. A continuación se recupera el anticuerpo policlonal a partir de sangre, ascites y similar, de un animal inmunizado de esta manera. Se coagula sangre recolectada y el suero se decanta, se clarifica mediante centrifugación y se somete a ensayo para el título de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales pueden purificarse a partir de suero o ascites según métodos estándares en la técnica, incluyendo cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etc.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature 256:495, 1975. Utilizando el método del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado tal como se ha indicado anteriormente, con el fin de inducir la producción por parte de linfocitos de anticuerpos que se unan específicamente a un antígeno inmunizador (RFCE, RFCE de tipo salvaje, RFCE exón 19 del, RFCE L858R y otras variantes de RFCE). Alternativamente, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Tras la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que seguidamente pueden seleccionarse separándolas de linfocitos y células de mieloma no fusionados. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno seleccionado (por ejemplo RFCE, RFCE de tipo salvaje, RFCE exón 19 del, RFCE L858R y otras variantes de RFCE) según se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) seguidamente pueden propagarse mediante cultivo *in vitro* utilizando métodos estándares (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o *in vivo* en forma de tumores de ascites en un animal. A continuación, los anticuerpos monoclonales pueden purificarse a partir del medio de cultivo o líquido ascites tal como se ha indicado para los anticuerpos policlonales, anteriormente.

Alternativamente, también pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando métodos de ADN recombinante tal como se describe en la patente US nº 4.816.567. Se aíslan los polinucleótidos codificantes de un anticuerpo monoclonal, tal como a partir de células B maduras o células de hibridoma, tal como mediante RT-PCR utilizando cebadores oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes codificantes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y se determina su secuencia utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados codificantes de las cadenas pesada y ligera seguidamente se clonan en vectores de expresión adecuados, que, al ser transfectados en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, en la que las células huésped generan anticuerpos monoclonales. Además, pueden aislarse anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de la especie deseada, a partir de bibliotecas de expresión génica, tal como ha sido descrito (McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554, 1990; Clackson *et al.*, Nature 352:624-628, 1991; y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991).

El polinucleótido o polinucleótidos codificantes de un anticuerpo monoclonal puede además modificarse de varias maneras diferentes utilizando tecnología de ADN recombinante con el fin de generar anticuerpos alternativos. En una realización, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo un anticuerpo monoclonal de ratón pueden sustituirse: 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano con el fin de generar un anticuerpo quimérico, o 2) para un polipéptido no inmunoglobulina con el fin de generar un anticuerpo de fusión. En otras realizaciones, las regiones constantes se truncan o se eliminan, generando el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Además, puede utilizarse la mutagénesis de alta densidad o dirigida a sitio de la región variable con el fin de optimizar la especificidad, la afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones de la presente exposición, el anticuerpo monoclonal contra RFCE, RFCE de tipo salvaje, RFCE exón 19 del, RFCE L858R y/o otras variantes de RFCE es un anticuerpo humanizado.

La presente exposición comprende además anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente RFCE, RFCE de tipo salvaje, RFCE exón 19 del, RFCE L858R y otras variantes de RFCE. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse específicamente en por lo menos dos epítopos diferentes.

Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos. Las técnicas para preparar anticuerpos biespecíficos son comunes de la técnica (Millstein *et al.*, Nature 305:537-539, 1983; Brennan *et al.*, Science 229:81, 1985; Suresh *et al.*, Methods in Enzymol. 121:120, 1986; Traunecker *et al.*, EMBO J. 10:3655-3659, 1991; Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225, 1992; Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553, 1992; Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368, 1994; y patente US nº 5.731.168).

En determinadas realizaciones de la invención, puede resultar deseable utilizar un fragmento de anticuerpo, al contrario que un anticuerpo intacto, con el fin de incrementar la penetración en los tejidos, por ejemplo, Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117, 1993, y Brennan *et al.*, Science 229:81, 1985). Sin embargo, estos fragmentos ahora se producen típicamente directamente por células huésped recombinantes tal como se ha indicado

anteriormente. De esta manera, los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse a partir de células de *E. coli* u otras células huésped, permitiendo de esta manera la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Alternativamente, dichos fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de bibliotecas fágicas de anticuerpos. El fragmento de anticuerpo también puede ser de anticuerpo lineales tal como se ha descrito en la patente US nº 5.641.870, por ejemplo, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia.

En algunas realizaciones, los anticuerpos indicados anteriormente se marcan con una fracción detectable que produce una señal detectable o que es parte de un sistema generador de señales. Las fracciones detectables se describen en mayor detalle posteriormente y entre ellas se incluyen haptenos, moléculas fluorescentes, enzimas, moléculas luminiscentes, puntos cuánticos y similares. En algunas realizaciones, se utiliza la detección directa en el caso de que la fracción detectable sea, por ejemplo, una molécula fluorescente, enzima, molécula luminiscente o puntos cuánticos. En algunas realizaciones, por ejemplo en el caso de que la fracción detectable sea un hapteno, se utiliza la detección indirecta del anticuerpo primario marcado con hapteno (por ejemplo el anticuerpo específico para una mutación de RFCE particular) mediante un sistema generador de señales. El experto en la materia será consciente de diversas técnicas para llevar a cabo lo anterior. En algunas realizaciones, el sistema generador de señales comprende por lo menos primer y segundo elementos de una pareja de unión. El primer elemento de la pareja de unión se conjugada con el anticuerpo primario y el segundo elemento de la pareja de unión se utiliza para detectar el primer elemento. En algunas realizaciones, se marca el segundo elemento con una fracción generadora de señales. En otras realizaciones, se utiliza para la detección un tercer elemento que se une al segundo elemento. En estas realizaciones, el tercer elemento comprende una fracción generadora de señales. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un hapteno y cualquiera de las cuatro amplias categorías de marcajes indicadas anteriormente puede conjugarse con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo un anticuerpo secundario) para conseguir la detección. En el caso de que se utilice un marcaje enzimático, se ponen en contacto sustratos del enzima con la muestra con el fin de producir una señal detectable. Alternativamente, en algunas realizaciones, el anticuerpo secundario no se encuentra marcado. En estas realizaciones, se utiliza un anticuerpo terciario que es específico para el anticuerpo secundario. Por ejemplo, en el caso de que el anticuerpo secundario sea un anticuerpo de conejo, el anticuerpo terciario puede ser un anticuerpo anticonejo conjugado con uno de los marcajes indicados anteriormente. De esta manera, puede conseguirse la conjugación indirecta del marcaje con el anticuerpo.

2. Sondas de ácidos nucleicos

La presente invención utiliza sondas de ácidos nucleicos. En realizaciones preferentes, las sondas de ácidos nucleicos se unen o se hibridan con partes de una secuencia diana de ácidos nucleicos (por ejemplo la secuencia para RFCE). Preferentemente, la sonda de ácidos nucleicos comprende cualquier ácido nucleico adecuado, tal como ARN (ácido ribonucleico), ADN (ácido desoxirribonucleico), ANB (ácido nucleico bloqueado), APN (ácido péptido-nucleico) o combinaciones de los mismos, y puede comprender tanto nucleótidos estándares, tales como ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, como análogos de nucleótidos.

En algunas realizaciones, la sonda de ácidos nucleicos es más de 80% complementaria a la parte deseada de la secuencia diana de ácidos nucleicos (por ejemplo la secuencia para RFCE), preferentemente una complementariedad superior a 90% respecto a la parte deseada de la secuencia diana de ácidos nucleicos, más preferentemente con una complementariedad superior al 99% respecto a la parte deseada de la secuencia diana de ácidos nucleicos, y todavía más preferentemente aproximadamente 100% complementaria respecto a la parte deseada de la secuencia diana de ácidos nucleicos. En general, el diseño de la sonda de ácidos nucleicos se lleva a cabo utilizando prácticas que son estándares de la técnica. Por ejemplo, generalmente se evitan secuencias que presentan autocomplementariedad, de manera que las sondas resultantes se plegarían sobre sí mismos o se hibridarían entre sí a expensas de la unión al ácido nucleico diana.

Una consideración durante la selección de una longitud para la parte de sonda diana es la complejidad de la muestra que contiene el ácido nucleico diana. Por ejemplo, el genoma humano presenta una longitud de aproximadamente 3×10^9 pares de bases. Aparecerá cualquier secuencia de 10 nucleótidos con una frecuencia de aproximadamente 2.861 veces por cada 3.000 millones de pares de bases. Una parte de sonda diana de dicha longitud presentaría una probabilidad reducida de unirse de forma exclusiva a una región de 10 nucleótidos dentro de una diana que presentase una secuencia del tamaño del genoma humano. Sin embargo, en el caso de que la secuencia diana se encuentre dentro de un plásmido de 3 kb, dicha oligonucleótido podría presentar una probabilidad muy razonable de unión de forma exclusiva. Mediante este cálculo puede observarse que un oligonucleótido de 16 nucleótidos (es decir, un 16-mero) es la longitud mínima de una secuencia que es matemáticamente probable que aparezca una vez en 3×10^9 pares de bases. Este nivel de especificidad también puede ser proporcionado por dos o más secuencias más cortas de ácidos nucleicos en el caso de que estén configuradas para unirse de manera cooperativa (es decir, de manera que puedan producir el complejo deseado únicamente en el caso de que ambos o todos se unan a sus secuencias diana deseadas), en la que la combinación de las secuencias cortas proporciona la especificidad deseada.

Una segunda consideración durante la selección de la longitud de la parte de sonda diana es el intervalo de temperaturas en el que se espera que funcione la parte de sonda diana. Un 16-mero de contenido medio de bases

(50% de bases G-C) presentará una T_m calculada de aproximadamente 41°C, dependiendo, entre otros factores, de la concentración de la sonda y su diana, el contenido de sales de la reacción y el orden exacto de los nucleótidos. Como cuestión práctica, las partes de sonda diana más largas habitualmente se seleccionan para mejorar la especificidad de la hibridación. Por ejemplo, pueden utilizarse partes de sonda diana de entre 20 y 25 nucleótidos de longitud, ya que es altamente probable que sean específicas en el caso de que se utilicen en reacciones realizadas a temperaturas que son próximas a sus T_m (a aproximadamente 5°C o menos de la T_m).

En realizaciones preferentes, la sonda de ácidos nucleicos está diseñada bajo dichas consideraciones, de manera que la parte de sonda diana se hibride con un ácido nucleico diana bajo condiciones adecuadas definidas por el usuario.

El ácido nucleico puede seleccionarse manualmente, o con ayuda de un algoritmo implementado por ordenador que optimice la selección de cebadores basándose en parámetros deseados, tales como la temperatura, la longitud, el contenido de GC, etc. Se encuentran disponibles numerosos algoritmos o programas implementados por ordenador para la utilización en internet o en un ordenador personal. Por ejemplo, para generar múltiples regiones de unión a partir de una secuencia diana de ácidos nucleicos (por ejemplo una secuencia diana genómica de ácidos nucleicos), se utilizan regiones de secuencia sin secuencias repetitivas de ácidos nucleicos (u otras secuencias no deseables, por ejemplo productora de fondo), por ejemplo manualmente o mediante la utilización de un algoritmo informático. Dentro de una secuencia diana de ácidos nucleicos (por ejemplo una secuencia genómica diana de ácidos nucleicos) que comprende entre varias kilobases y varios centenares de kilobases, típicamente se identifican numerosas regiones de unión que se encuentran sustancial o completamente libres de secuencias repetitivas de ácidos nucleicos (u otras secuencias no deseables, por ejemplo productoras de fondo).

Las sondas de ácidos nucleicos pueden sintetizarse mediante cualquier método conocido. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes de las sondas de ácidos nucleicos se clonan en un vector de expresión plasmídico. La sonda de ácidos nucleicos preferentemente se transcribe a partir del vector con una ARN polimerasa, proporcionando una molécula de ARN codificante de la sonda de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la sonda de ácidos nucleicos se sintetiza químicamente, por ejemplo utilizando análogos de fosforamidita. En algunas realizaciones, las sondas de ADN se sintetizan mediante propagación, purificación y digestión de restricción del ADN plasmídico, proporcionando una molécula de ADN codificante de la sonda de ácidos nucleicos diana. El ADN de doble cadena puede desnaturalizarse posteriormente en cadenas sencillas para la utilización en protocolos de hibridación. En algunas realizaciones, las sondas diana de ácidos nucleicos se sintetizan mediante PCR asimétrica. En algunas realizaciones, un cebador podría ser, por ejemplo, un análogo de ácido nucleico (por ejemplo ANB). Este procedimiento genera una sonda con la parte específica diana que contiene nucleótidos bloqueados, estando constituida la parte diana de detección por dNTP estándares. En algunas realizaciones, el cebador que contiene ANB contiene una biotina para facilitar la purificación de la cadena deseada.

En alguna realización, las sondas de ácidos nucleicos comprenden una o más fracciones detectables. En algunas realizaciones, las fracciones detectables son directamente detectables, mientras que en otras realizaciones, las fracciones detectables son indirectamente detectables. En algunas realizaciones, las fracciones detectables son fracciones generadoras de señales que producen una señal detectable. En algunas realizaciones, la fracción detectable se conjuga con nucleótidos o análogos de nucleótidos utilizados en la síntesis de la sonda de detección. Por ejemplo, se utilizan fosforamiditas nucleósidos que se conjugan con una fracción detectable deseada, para sintetizar una sonda de detección mediante síntesis química, tal como es conocido de la técnica.

En algunas realizaciones, la fracción detectable se detecta indirectamente. En algunas realizaciones, la fracción detectable es un primer elemento de un sistema generador de señales. En estas realizaciones, se incorporan en la sonda de detección nucleótidos conjugados con un primer elemento de una pareja de unión, preferentemente mediante la utilización de fosforamiditas nucleósidos conjugadas con el primer elemento de la pareja de unión. A continuación, la muestra se pone en contacto con un agente de unión específica que comprende el segundo elemento de la pareja de unión (es decir, una fracción de unión específica). En algunas realizaciones, el segundo elemento de la pareja de unión se conjuga con una fracción generadora de señales y se utiliza para detectar la sonda de detección mediante la unión al primer elemento de la pareja de unión. En otras realizaciones, la muestra se pone en contacto con un tercer elemento de unión que se une al segundo elemento de unión. En estas realizaciones, el tercer elemento de unión se conjuga con una fracción generadora de señales. Entre los ejemplos de sistemas de moléculas de unión adecuados se incluyen, aunque sin limitación, avidina, biotina, haptenos, anticuerpos antihapteno y anticuerpos anti-anticuerpo, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la parte de fracción detectable de la sonda de detección comprende uno o más nucleótidos haptenilados. Estos nucleótidos haptenilados se detectan mediante la utilización de un anticuerpo antihapteno y un anticuerpo anti-(anticuerpo antihapteno) que se conjuga con una fracción generadora de señales.

Sistemas generadores de señales

Tal como se ha indicado anteriormente, los sistemas y métodos de la presente invención utilizan una diversidad de reactivos, por ejemplo moléculas de unión a antígeno y sondas de ácidos nucleicos que se marcan con fracciones detectables para la detección directa (es decir, se marcan con fracciones generadoras de señales) o para la

5 detección directa (es decir, se marcan con una fracción detectable) que es un primer elemento de una pareja de
 unión o sistema generadora de señales. La presente invención no se encuentra limitada a ningún marcaje o señal
 particular. En efecto, puede utilizarse una diversidad de señales y sistemas generadores de señales en los sistemas
 y métodos descritos, incluyendo, aunque sin limitación, señales colorimétricas, señales fluorescentes, señales
 luminiscentes y similares. En algunas realizaciones preferentes, se utilizan señales colorimétricas. En algunas
 realizaciones preferentes, los anticuerpos primarios y las sondas de ácidos nucleicos se detectan mediante
 detección indirecta mediante la utilización de anticuerpos primarios haptenilados y sondas de ácidos nucleicos. En
 algunas realizaciones preferentes adicionales, las señales son compatibles entre sí de manera que pueden
 visualizarse simultáneamente en una muestra de un paciente múltiples señales (por ejemplo señales para las dos
 mutaciones de RFCE y la amplificación de RFCE).

15 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en algunas realizaciones, la presente exposición proporciona sistemas
 generadores de señales que utilizan anticuerpos primarios haptenilados y sondas de ácidos nucleicos. Entre dichos
 haptenos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, pirazoles, particularmente nitropirazoles, compuestos nitrofenilo,
 benzofurazanos, triterpenos, ureas y tioureas, particularmente fenilureas y todavía más particularmente feniltioureas,
 rotenona y derivados de rotenona, también denominados en la presente memoria rotenoides, oxazol y tiazolas,
 particularmente oxazol y tiazol-sulfonamidas, coumarina y derivados de coumarina, ciclolignanos, ejemplificados por
 podofilotoxina y derivados de podofilotoxina, y combinaciones de los mismos. Entre los ejemplos específicos de
 haptenos se incluyen, aunque sin limitación, 2,4-dinitrofenilo (DNP), biotina, derivados de fluoresceína (FITC,
 TAMRA, rojo Texas, etc.), digoxigenina (DIG), 5-nitro-3-pirazolcarbamida (nitropirazol, NP), 4,5-dimetoxi-2-
 nitrocinamida (nitrocinamida, NCA), 2-(3,4-dimetoxifenil)-quinolín-4-carbamida (fenilquinolona, DPQ), 2,1,3-
 benzoxadiazol-5-carbamida (benzofurazano, BF), 3-hidroxi-2-quinoxalincarbamida (hidroxiquinoxalina, HQ), 4-
 (dimetilamino)azobencén-4'-sulfonamida (DABSYL), rotenona-isoxazolina (Rot), (E)-2-(2-(2-oxo-2,3-dihidro-1H-
 benzo[b][1,4]diazepín-4-il)fenozil)actamida (benzodiazepina, BD), ácido 7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromén-3-
 25 carboxílico (coumarina 343, CDO), 2-acetamido-4-metil-5-tiazolsulfonamida (tiazolsulfonamida, TS) y p-
 metoxifenilpirazopodofilamida (podo). Estos haptenos y su utilización en sondas se describen en mayor detalle en
 las solicitudes copropietarias publicadas de patente US n° 2008/0305497, n° 2008/0268462 y n° 2008/0057513.

30 En realizaciones en las que el anticuerpo primario o sonda de ácidos nucleicos comprende haptenos, el segundo
 elemento del sistema generador de señales preferentemente es una molécula que se une al hapteno, tal como una
 molécula de unión a antígeno. Entre las moléculas de unión a antígeno adecuadas se incluyen, aunque sin
 limitación, anticuerpos, inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina (incluyendo, a título de ejemplo y sin
 limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab',
 fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab, tales como los conocidos de la técnica, fragmentos de anticuerpo
 recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos F(ab')₂, proteínas Fv de cadena sencilla
 ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas por disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (tales como son conocidos de la
 técnica) y anticuerpos de camélidos (ver, por ejemplo, las patentes US n° 6.015.695, n° 6.005.079-5.874.541, n°
 5.840.526, n° 5.800.988 y n° 5.759.808). En algunas realizaciones, se une una fracción detectable que genera una
 señal detectable, covalentemente o de otra manera, a la molécula de unión a antígeno. Entre los ejemplos de
 40 elementos de la segunda pareja de unión adecuadas se incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos anti-DNP, anti-
 biotina, anti-FITC, anti-DIG, anti-NP, anti-NCA, anti-DPQ, anti-BF, anti-HQ, anti-DABSYL, anti-Rot, anti-BD, anti-
 CDO, anti-TS y anti-Podo, que se conjugan con una fracción detectable que genera una señal detectable. En
 realizaciones adicionales, un segundo elemento del sistema de molécula de unión es un anticuerpo primario
 antihapteno que no comprende una fracción detectable. En estas realizaciones, el tercer elemento del sistema de
 45 molécula de unión es un anticuerpo secundario anti-anticuerpo (tal como un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón)
 que comprende una fracción detectable que genera una señal que se utiliza para generar una señal detectable.

50 Los sistemas generadores de señales de la presente exposición comprenden una fracción generadora de señales.
 En realizaciones preferentes, la fracción generadora de señales puede detectarse mediante cualquier mecanismo
 conocido o todavía no descubierto, incluyendo la absorción, la emisión y/o la dispersión de un fotón (incluyendo la
 radiofrecuencia, la frecuencia de microondas, la frecuencia de infrarrojos, la frecuencia visible y los fotones de
 frecuencia ultravioleta). Entre las fracciones generadoras de señales se incluyen las moléculas y materiales de color,
 fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en
 otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (tal como mediante la conversión de una sustancia
 55 incolora en una sustancia de color, o viceversa, o mediante la producción de un precipitado o el incremento de la
 turbidez de la muestra) y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos.

60 En algunas realizaciones preferentes, la fracción generadora de señales es un enzima. Entre los enzimas
 adecuados se incluyen, aunque sin limitación, luciferasas (por ejemplo la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa
 bacteriana, patente US n° 4.737.456), la luciferina, las 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa,
 peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (PRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa,
 lisoxima, sacárido oxidadas (por ejemplo glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa),
 oxidadas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las
 técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos han sido descritas en O'Sullivan *et al.*, Methods for the Preparation
 of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, en: Methods in Enzym. (editores J. Langone y H.
 65 Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166, 1981). En el caso de que el marcaje detectable incluya un

enzima, puede utilizarse un cromógeno, compuesto fluorogénico o compuesto luminogénico en combinación con el enzima para generar una señal detectable (se encuentran disponibles comercialmente un gran número de dichos compuestos, por ejemplo de Invitrogen Corporation, Eugene Oreg.). Entre los ejemplos particulares de compuestos cromogénicos se incluyen diaminobencidina (DAB), 4-nitrofenilfosfato (pNPP), rojo Fast, fosfato de bromoclorindolilo (BCIP), nitroazul de tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, rojo Fast, naranja AP, azul AP, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolín-sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-Gal), metil-umbeliferil-beta-D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil-α-D-galactopiranosido (X-Gluc), 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul tetrazolio y violeta tetrazolio.

Alternativamente, puede utilizarse un enzima en un esquema detección metalográfica. Por ejemplo, el procedimiento SISH implica esquemas de detección metalográfica para la identificación y localización de una secuencia genómica diana de ácidos nucleicos hibridada. Entre los métodos de detección metalográfica se incluyen la utilización de un enzima, tal como fosfatasa alcalina, en combinación con un ión metálico soluble en agua y un sustrato redox-inactivo del enzima. El sustrato es convertido en un agente redox-activo por el enzima y el agente redox-activo reduce el ión metálico, provocando que forme un precipitado detectable (ver, por ejemplo, la solicitud publicada de patente US nº 2005/0100976, la solicitud publicada de patente PCT nº 2005/003777 y la solicitud publicada de patente US nº 2004/0265922). Entre los métodos de detección metalográfica se incluyen la utilización de un enzima oxidorreductasa (tal como peroxidasa de rábano picante), conjuntamente con un ión metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, nuevamente para formar un precipitado detectable (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.670.113).

Entre los ejemplos particulares de fracciones generadoras de señales útiles en la presente invención se incluyen moléculas fluorescentes (o fluorocromos). Son conocidos por el experto en la materia numerosos fluorocromos y pueden seleccionarse, por ejemplo, de Invitrogen, por ejemplo ver *The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Invitrogen Detection Technologies, Molecular Probes, Eugene, Oreg.). Entre los ejemplos de fluoróforos particulares que pueden unirse (por ejemplo conjugarse químicamente) a una molécula de ácidos nucleicos o proteína, tal como una molécula de unión a antígeno, se incluyen, aunque sin limitación, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianato-estilbén-2,2'-disulfónico, acridina y derivados tales como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalén-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5-disulfonato (amarillo Lucifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, amarillo brillante, coumarina y derivados, tales como coumarina, 7-amino-4-metilcoumarina (AMC, coumarina 120), 7-amino-4-metilcoumarina (Coumarán 151), cianosina, 4'-6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), 5',5"-dibromopirgalol-sulfonaftaleína (rojo bromopiragalol), 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina, pentaacetato de dietilentriammina, ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbén-2,2'-disulfónico, ácido 4,4'-diisotiocianato-estilbén-2,2'-disulfónico, cloruro de 5-[dimetilamino]naftalén-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo), ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC), eosina y derivados,, tales como eosina e isotiocianato de eosina, eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina, etidio, fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4'S'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), y QFITC (XRITC), 2',7'-difluoresceína (OREGON GREEN™), fluorescamina, IR144, IR1446, isotiocianato de verde malaquita, 4-metil-umbeliferona, ortocresolftaleína, nitrotirosina, pararosanilina, rojo fenol, ficoeritrina B, o-ftaldialdehído, pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil-1-pireno, Rojo Reactivo 4 (rojo brillante 3B-A Cibacron™), rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), cloruro de sulfonilo de lisamina-rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, verde de rodamina, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 y derivado cloruro de sulfonilo de sulforrodamina 101 (rojo Texas), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), tetrametil-rodamina, isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC), riboflavina, ácido rosólico y derivados quelatos de terbio.

Entre otros fluoróforos adecuados se incluyen quelatos de europio reactivos con tiol que emiten a aproximadamente 617 nm (Heyduk y Heyduk, *Analyt. Biochem.* 248:216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274:3315-22, 1999), así como GFP, lisamina, dietilamino-coumarina, fluoresceína clorotriazinilo, naftofluoresceína, 4,7-diclororrodamina y xanteno (tal como se describe en la patente US nº 5.800.996 de Lee *et al.*) y derivados de los mismos. También pueden utilizarse otros fluoróforos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo los disponibles de Invitrogen Detection Technologies, Molecular Probes (Eugene, Oreg.) e incluyendo la serie de pigmentos Alexa Fluor™ (por ejemplo tal como se describen en las patentes US nº 5.696.157, nº 6.130.101 y nº 6.716.979), la serie de pigmentos BODIPY (pigmentos difluoruro de dipirrometén-boro, por ejemplo tal como se describe en las patentes US nº 4.744.339, nº 5.187.288, nº 5.248.782, nº 5.274.113, nº 5.338.854, nº 5.451.663 y nº 5.433.896), azul Cascade (un derivado reactivo con aminas del pireno sulfonado descrito en la patente US nº 5.132.432) y azul Marina (patente US nº 5.830.912).

Además de los fluorocromos indicados anteriormente, un marcaje fluorescente puede ser una nanopartícula fluorescente, tal como un nanocrystal semiconductor, por ejemplo un QUANTUM DOT™ (obtenido de, por ejemplo, QuantumDot Corp., Invitrogen Nanocrystal Technologies, Eugene, Oreg.; ver también las patentes US nº 6.815.064, nº 6.682.596 y nº 6.649.138). Los nanocristales semiconductores son partículas microscópicas que presentan propiedades ópticas y/o eléctricas dependientes del tamaño. Al iluminar nanocristales semiconductores con una

fuerza de energía primaria, se produce una emisión secundaria de energía de una frecuencia que corresponde al hueco de banda del material semiconductor utilizado en el nanocrystal semiconductor. Esta emisión puede detectarse en forma de luz de color de una longitud de onda específica, o fluorescencia. Se describen nanocrystal semiconductores con diferentes características espectrales en, por ejemplo, la patente US nº 6.602.671. Los nanocrystal semiconductores pueden acoplarse con una diversidad de moléculas biológicas (incluyendo dNTP y/o ácidos nucleicos) o sustratos mediante técnicas descritas en, por ejemplo, Bruchez *et al.*, Science 281:2013-6, 1998; Chan *et al.*, Science 281:2016-8, 1998 y en la patente US nº 6.274.323).

Se da a conocer la formación de nanocrystal semiconductores de diversa composición en, por ejemplo, las patentes US nº 6.927.069, nº 6.914.256, nº 6.855.202, nº 6.709.929, nº 6.689.338, nº 6.500.622, nº 6.306.736, nº 6.225.198, nº 6.207.392, nº 6.114.038, nº 6.048.616, nº 5.990.479, nº 5.690.807, nº 5.571.018, nº 5.505.928, nº 5.262.357 y en la solicitud publicada de patente US nº 2003/0165951, así como la patente PCT publicada nº 99/26299 (publicada el 27 de mayo de 1999). Pueden producirse poblaciones separadas de nanocrystal semiconductores que son identificables basándose en sus diferentes características espectrales. Por ejemplo, pueden producirse nanocrystal semiconductores que emiten luz de diferentes colores basándose en su composición, tamaño o tamaño y composición. Por ejemplo, se encuentran disponibles de Invitrogen puntos cuánticos que emiten luz a diferentes longitudes de onda basadas en el tamaño (longitudes de onda de emisión: 565 nm, 655 nm, 705 nm o 800 nm), las cuales resultan adecuadas como marcajes fluorescentes en las sondas dadas a conocer en la presente memoria.

Entre las fracciones adicionales generadoras de señales se incluyen, por ejemplo, isótopos radioactivos (tales como ^3H , ^{35}S y ^{32}P), quelatos metálicos tales como los quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radioactivos o paramagnéticos como Gd^{3+} y liposomas.

En algunas realizaciones, la fracción generadora de señales es una proteína fluorescente. Las proteínas fluorescentes también pueden utilizarse como portador o pueden acoplarse con un portador, para facilitar la visualización. Por ejemplo, la proteína fluorescente verde (PFV) fue aislada originalmente a partir del órgano emisor de luz de la medusa *Aequorea victoria*. Las fusiones de PFV quiméricas pueden expresarse *in situ* mediante transferencia génica a células y pueden localizarse en sitios particulares dentro de la célula a partir de las señales diana apropiadas. Se han generado con éxito variantes espectrales de emisiones azul, cian y amarillenta-verde a partir de la PFV de *Aequorea*, pero ninguna emitía máximos de emisión más largos de 529 nm. Se han aislado proteínas de tipo PFV a partir de *Anthozoa* (animales coralinos) que han expandido significativamente el abanico de colores disponible para aplicaciones biológicas. La familia de las 'proteínas de tipo PFV' depositadas en las bases de datos de secuencias ahora incluye aproximadamente 30 elementos significativamente diferentes. Las proteínas fluorescentes se refieren a proteínas que pueden convertirse espontáneamente en fluorescentes mediante la síntesis autocatalítica de un cromóforo. Se conocen proteínas que emiten fluorescencia en las longitudes de onda roja o roja lejana (proteínas fluorescentes rojas o PFR). Las PFR pueden utilizarse en combinación con otras proteínas fluorescentes que emiten fluorescencia a longitudes de onda más cortas para experimentos tanto de marcaje multicolor como de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET). Las PFR disponibles comercialmente se derivaron de dos proteínas de tipo PFV de tipo salvaje. La DsRed (drFP583) presenta máximos de excitación y emisión en 558 nm y 583 nm, respectivamente. Se generó una proteína fluorescente del rojo lejano mediante mutagénesis de una cromoproteína que absorbe a 571 nm. HcRed1 (Clontech) presenta máximos de excitación y emisión en 588 nm y 618 nm, respectivamente. La proteína fluorescente que emite fluorescencia a la longitud de onda más larga (sin introducción de ninguna mutación) era eqFP611, clonada a partir de la anémona marina *Entacmaea quadricolor*. Esta proteína absorbe en 559 nm y emite en 611 nm.

2. Inmunohistoquímica

La presente exposición describe además la detección concurrente de dos o más formas de RFCE (por ejemplo de tipo salvaje, mutaciones de RFCE (por ejemplo exón 19 del, L858R, etc.). En algunas realizaciones, se detectan dos o más (por ejemplo 2, 3, 4, 5, etc.) formas mutantes de RFCE con reactivos (por ejemplo anticuerpos) de la presente invención. En algunas realizaciones, se detectan múltiples formas de RFCE en células, tejidos, tumores, cultivo celular, una muestra, etc. En algunas realizaciones, se detectan múltiples formas de RFCE en una muestra de tejido (por ejemplo sección, cilindro, biopsia, etc.) de un sujeto que se sospecha que presenta cáncer, un sujeto diagnosticado de cáncer y/o un sujeto que sufre de cáncer. En algunas realizaciones, se detectan, identifican y/o cuantifican múltiples formas mutantes de RFCE en una muestra (por ejemplo una muestra de tejido). En algunas realizaciones, la presente invención comprende la detección concurrente de RFCE exón 19 del y RFCE L858R.

En algunas realizaciones, se lleva a cabo inmunohistoquímica en una muestra de tejido para detectar el número de copia génica de un gen de interés (por ejemplo RFCE). Se ha demostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejidos es un método fiable para evaluar la alteración de las proteínas en un tejido heterogéneo. La técnica inmunohistoquímica (IHQ) utiliza un anticuerpo para sondear y visualizar los antígenos celulares *in situ*, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Esta técnica resulta excelente ya que evita los efectos no deseados de desagregación y permite la evaluación morfológica de células individuales. Además, la proteína diana no resulta alterada por el procedimiento de congelación.

En algunas realizaciones, se lleva a cabo IHQ mediante un ensayo directo o indirecto. En un ensayo IHQ directo, la unión del anticuerpo al antígeno diana se determina directamente. Este ensayo directo utiliza un reactivo marcado (por ejemplo una tinción, etiqueta fluorescente, anticuerpo primario marcado enzimáticamente, etc.), que puede visualizarse sin interacción adicional del anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, se une un anticuerpo primario no conjugado al antígeno y después un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario se conjuga con un pigmento o con un marcaje enzimático. En algunas realizaciones, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. En algunas realizaciones, los ensayos indirectos proporcionan una amplificación de las señales mediante la interacción de varios anticuerpos secundarios con diferentes epítomos en el anticuerpo primario.

En algunas realizaciones, tras una etapa de bloqueo opcional, se expone una muestra, sección o cilindro de tejido al anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y bajo condiciones adecuadas de manera que el anticuerpo primario se una al antígeno proteico diana en la muestra. Las condiciones ejemplares apropiadas para conseguir la unión se proporcionan en la presente memoria y son entendidas por el experto en la materia. En algunas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina mediante la utilización de cualquiera de los marcajes detectables y técnicas comentadas anteriormente. En algunas realizaciones, la detección requiere microscopía, fluorimetría y/o métodos de detección adicionales. En algunas realizaciones las muestras se montan y se aplican cubreobjetos en preparación para la detección.

En algunas realizaciones, la detección de múltiples formas de RFCE con anticuerpos se lleva a cabo concurrentemente y/o conjuntamente con uno o más ensayos y/o técnicas de detección adicionales. La presente invención puede comprender, aunque sin limitación, la detección de múltiples formas de RFCE mediante inmunohistoquímica (por ejemplo la detección de anticuerpos), la detección y/o cuantificación de RFCE mediante hibridación *in situ* (por ejemplo la hibridación *in situ* cromogénica (CISH), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la hibridación *in situ* con plata (SISH), etc.), la amplificación por PCR de una o más formas de RFCE, etc.

3. Hibridación *in situ*

La presente exposición describe además composiciones y métodos para la detección y/o cuantificación de secuencias genéticas asociadas a RFCE (por ejemplo todas las formas de RFCE, RFCE de tipo salvaje, RFCE mutante (por ejemplo RFCE exón 19 del y RFCE L858R, etc.). En algunas realizaciones, entre los reactivos de la presente invención para la detección y/o cuantificación de secuencias relacionadas con RFCE se incluyen, aunque sin limitación, proteínas (Por ejemplo proteínas de unión a antígeno, inmunoglobulinas, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados, fragmentos Fab, etc.), ácidos nucleicos (por ejemplo sondas oligonucleótidas, sondas de conjugado de marcaje-oligonucleótido, etc.), moléculas de pequeño tamaño, etc. En algunas realizaciones, se utilizan sondas de ácidos nucleicos para detectar y/o cuantificar secuencias relacionadas con RFCE en células, cultivos celulares, tejidos, muestras de tejidos, muestras de tumores, etc. En algunas realizaciones, sondas oligonucleótidas marcadas (por ejemplo sondas marcadas con cromóforo, sondas marcadas con fluoróforo, sondas marcadas radioactivamente, sondas unidas a enzimas, etc.) proporcionan la identificación, detección y/o cuantificación de secuencias genéticas asociadas a RFCE. En algunas realizaciones, la hibridación *in situ* (por ejemplo FISH, CISH, etc.) proporciona la detección y/o cuantificación de secuencias relacionadas con RFCE. En algunas realizaciones, la hibridación *in situ* cromogénica proporciona la detección y/o la cuantificación de las secuencias de RFCE (por ejemplo todos los RFCE, formas mutantes de RFCE (por ejemplo RFCE exón 19 del y RFCE L858R, etc.), RFCE de tipo salvaje, etc.).

En algunas realizaciones, la detección y/o la cuantificación de las secuencias relacionadas con RFCE rinde una evaluación exacta y/o estimada del número de copia del gen *RFCE*. En algunas realizaciones, la detección, cuantificación y/o estimación del número de copia del gen *RFCE* proporciona una evaluación de la ganancia de número de copia génica (por ejemplo cambios en el número de copia génica). En algunas realizaciones, la comparación entre la copia génica medida con un valor estándar, con un estándar o referencia medido y/o con otra muestra del mismo sujeto (por ejemplo tejido de una localización diferente, una muestra de tejido obtenida en un tiempo diferente) proporciona una evaluación del cambio de número de copia génica (por ejemplo la ganancia del número de copia del gen *RFCE*). En algunas realizaciones, el incremento del número de copia génica es el resultado de la amplificación génica en un tejido.

En algunas realizaciones, la amplificación del gen *RFCE* (por ejemplo el incremento del número de copia del gen *RFCE*) y la mutación de *RFCE* (por ejemplo RFCE exón 19 del, RFCE L858R, etc.) están ligadas y/o asociadas (Okabe *et al.*, Cancer Res. 67(5), 2007). En algunas realizaciones, las mutaciones de *RFCE* y el número de copia de *RFCE* son indicativos de resultado clínico en los pacientes de cáncer (pacientes de CPCNP). En algunas realizaciones, las mutaciones de *RFCE* y el número de copia incrementado se encuentran significativamente asociados a resultados clínicos positivos en los pacientes (por ejemplo en pacientes de cáncer, pacientes de cáncer de mama, pacientes de cáncer de pulmón, pacientes de CPCNP, pacientes tratados con inhibidores de receptor de tirosina quinasa de molécula pequeña (por ejemplo gefitinib)) (Takano *et al.*, J. Clin. Oncol. 23:6829-6837). En algunas realizaciones, los niveles elevados de expresión del gen *RFCE* corresponden a la amplificación del gen *RFCE* (número de copia elevado del gen *RFCE*, por ejemplo ganancia del número de copia de *RFCE*, etc.) (Wong *et*

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6899-6903). En algunas realizaciones, la amplificación del gen RFCE corresponde a la sobreexpresión de RFCE (Bhargava *et al.*, Modern Pathology 18:1027-1033, 2005).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la detección del número de copia génica de RFCE mediante la utilización de técnicas de hibridación *in situ* (por ejemplo la hibridación *in situ* con plata o cromogénica). En algunas realizaciones, se aplican técnicas de hibridación *in situ* estándar. Las técnicas de hibridación *in situ* estándares se describen en la técnica (por ejemplo Gall y Pardue, Methods in Enzymology 21:470-480, 1981); Henderson, International Review of Cytology 76:1-46, 1982; Angerer *et al.*, Genetic Engineering: Principles and Methods, Setlow y Hollaender, editores, vol. 7, páginas 43 a 65 (Plenum Press, New York, 1985).

En algunas realizaciones, la hibridación *in situ* comprende las etapas principales siguientes: (1) fijación del tejido o estructura biológica que debe examinarse, (2) tratamiento de prehibridación de la muestra biológica para incrementar la accesibilidad del ADN diana y para reducir la unión no específica, (3) sonda de hibridación del ácido nucleico en la muestra biológica, (4) lavados posteriores a la hibridación para eliminar sonda no unida en híbridos específicos, y (5) detección de las sondas hibridadas. Estas etapas, los reactivos utilizados y sus condiciones de utilización varían en diferentes realizaciones de la presente invención.

En algunas realizaciones, la presente exposición proporciona sondas oligonucleótidas configuradas para hibridarse con regiones del gen *RFCE*. En algunas realizaciones, las sondas de RFCE se configuran para unirse a regiones del gen RFCE bajo condiciones de baja astringencia. En algunas realizaciones, las sondas de RFCE se configuran para unirse a las regiones del gen *RFCE* bajo condiciones de astringencia moderada, pero no bajo condiciones de baja astringencia. En algunas realizaciones, las sondas de RFCE se configuran para unirse a las regiones del gen *RFCE* sólo bajo condiciones de alta astringencia.

En algunas realizaciones, la hibridación *in situ* comprende la hibridación *in situ* cromogénica (CISH), la hibridación *in situ* con plata (SISH) o la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En algunas realizaciones, se lleva a cabo la CISH para la región del gen *RFCE*. Por ejemplo, se incuban secciones de tejido a 55°C durante la noche. Se desparafinan las secciones en xileno y gradación de etanoles. Se lleva a cabo el pretratamiento térmico en el tampón de pretratamiento (Zymed Laboratories Inc.) a una temperatura de entre 98°C y 100°C durante 15 minutos. Se digiere el tejido con pepsina durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la aplicación de la sonda de RFCE, se cubren los portaobjetos con cubreobjetos y los bordes se sellan con cemento de caucho. Los portaobjetos se calientan a 95°C durante 5 minutos seguido de la incubación durante la noche a 37°C utilizando una cámara humidificada. Se lleva a cabo un lavado posterior a la hibridación y seguido de la inmunodetección utilizando un kit de detección de polímero CISH (por ejemplo de Zymed Laboratories Inc.). Se realiza un recuento de las señales de CISH utilizando un microscopio óptico con un objetivo de x40. En algunas realizaciones, se interpreta un tumor como positivo para la amplificación génica en el caso de que el número medio de copias génicas sea de 45 por núcleo. El experto en la materia podrá ajustar los parámetros para optimizar la hibridación *in situ*.

La hibridación *in situ* cromogénica (CISH) es una técnica que permite llevar a cabo métodos de hibridación *in situ* y la detección con un microscopio de campo brillante, en lugar de un microscopio de fluorescencia según se requiera para FISH. Aunque FISH requiere un microscopio de fluorescencia dotado de un objetivo de inmersión en aceite de 60X o 100X de alta calidad y filtros de fluorescencia multi-paso de banda (no utilizados en la mayoría de los laboratorios de rutina diagnóstica), CISH permite la detección con microscopios ópticos (de campo brillante) estándares (que generalmente son utilizados en los laboratorios diagnósticos). CISH generalmente no palidece, permitiendo archivar las muestras de tejidos y revisarlas posteriormente. El detalle histológico se aprecia mejor con la detección de campo brillante, lo que resulta posible con la detección de CISH. Pueden escanearse rápidamente grandes regiones de sección de tejido tras la contratación de CISH ya que el detalle morfológico es fácilmente visible utilizando objetivos de baja magnificación (por ejemplo 10X y 20X), mientras que la detección de FISH generalmente requiere una magnificación sustancialmente más alta (reduciendo de esta manera el campo de visión).

Los métodos de hibridación *in situ* cromogénicos/colorimétricos generales se describen en el documento nº WO00/26415 de Fletcher *et al.*, y en la publicación de patente US nº 2003/0017491. Los reactivos particulares y las etapas para llevar a cabo CISH en muestras de tejidos fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE), así como muestras celulares/muestras de cromosomas en metafase se describen en el documento nº WO00/26415 y en la publicación de patente US nº 2003/0017491, y en la sección presentada posteriormente. Resulta importante que la descripción detallada posteriormente proporciona métodos, procedimientos y reactivos ejemplares y no debe interpretarse como limitativa de la presente invención.

4. Diagnósticos y kits

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención se aplican en tejidos, células, tejido de biopsia, muestras de tejido (por ejemplo cilindros, secciones, etc.), etc., de sujetos que se sospecha que presentan cáncer, han sido diagnosticados de cáncer y/o que sufren de cáncer. En algunas realizaciones, se realizan secciones de biopsias de tejidos y se detectan las proteínas utilizando, por ejemplo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (por ejemplo CISH, FISH, etc.).

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención encuentran utilidad en el acceso y tratamiento de cánceres, incluyendo, aunque sin limitación, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas plapares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, cáncer pulmonar de células no pequeñas, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, carnofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits según se define en la reivindicación 16, para la detección, caracterización y/o cuantificación de formas mutantes de RFCE.

PARTE EXPERIMENTAL

La sección siguiente proporciona realizaciones ejemplares de la presente invención y no debe considerarse limitativa del alcance de la misma con respecto a realizaciones alternativas que no se describen explícitamente en la presente memoria.

Ejemplo 1

Composiciones y métodos para el ensayo de genes-proteínas

La sección siguiente proporciona realizaciones ejemplares de la presente invención y no debe considerarse limitativa del alcance de la misma con respecto a realizaciones alternativas que no se describen explícitamente en la presente memoria. Las figuras 1 a 16 proporcionan ejemplos de tejidos sometidos a las composiciones y métodos descritos en la presente memoria.

Anticuerpos anti-RFCE. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales anti-RFCE de conejos específicos de mutantes L858R (clon 43B2) y anti-RFCE específicos de E746-A750del (clon 6B6) de Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA. Los anticuerpos se diluyeron en diluyente de anticuerpos Signalstain (Cell Signaling Technology) en una relación de 1:30.

Sonda de RFCE. La sonda de RFCE Inform marcada con DNP, traducida a partir de muesca (nº de catálogo 980-4343) se obtuvo de Ventana medical Systems, Inc., Tucson, AZ.

Micromatriz de tejidos tumorales de xenoinjerto. Se fijaron los tumores de xenoinjerto siguientes en formalina tamponada neutra al 10% y se incluyeron en parafina: H460 (gen RFCE de monosomía, proteína RFCE de tipo salvaje), H3255 (gen RFCE amplificado, proteína RFCE L858R), A549 (gen RFCE de trisomía, proteína RFCE de tipo salvaje), RVH6849 (gen RFCE amplificado, proteína RFCE de tipo salvaje), HCC827 (gen RFCE amplificado, proteína RFCE E746-A750del) y A431 (gen RFCE amplificado, proteína RFCE de tipo salvaje). Se prepararon cilindros de tejido a partir de cada tumor de xenoinjerto y se reincluyeron en parafina como micromatriz de tejidos con 6 cilindros de tejido tumoral de xenoinjerto.

Protocolos de detección de mutación de RFCE. Utilizando un método de genes-proteínas de color dual, se llevó a cabo la detección mediante inmunohistoquímica (IHQ) de RFCE previamente a la hibridación *in situ* (ISH) de RFCE. Los portaobjetos se desparafinaron utilizando EZ Prep (nº de catálogo 950-102) en BenchMark XT. A continuación, los portaobjetos se sometieron a pretratamiento térmico utilizando acondicionamiento celular 1 (nº de catálogo 950-124) previamente a la incubación de anticuerpos. Se dispuso sobre los portaobjetos mezcla de anticuerpo específico de mutante L858R y anticuerpo E746-A750DEL y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras lavar los portaobjetos con tampón de reacción (catálogo nº 950-300), se aplicó anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina (FA) sobre los portaobjetos y se incubaron durante 16 minutos a 37°C. Se llevó a cabo el revelado de color con naftol o azul Fast. A continuación, los portaobjetos se procesaron para el pretratamiento térmico con tampón de reacción y se digirieron con proteasa 3 de ISH (nº de catálogo 780-4149). Se aplicó sonda de RFCE a las secciones de tejido y se hibridaron durante 5 horas tras la etapa de codensnaturalización de sonda y diana. Se llevaron a cabo etapas de lavado de astringencia con SSC (nº de catálogo 950-110) y se incubaron secciones de tejido con anticuerpo monoclonal de conejo anti-DNP (nº de catálogo 780-4335). A continuación, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo anticonejo conjugado con AP y se llevó a cabo el revelado del color con naftol y rojo Fast (basado en un solicitud de patente provisional de Ventana). Las secciones de tejido se contratiñeron con hematoxilina II (nº de catálogo 790-2208) y reactivo azulante (nº de catálogo 760-2037).

Utilizando un método de genes proteínas de triple color, se llevó a cabo la detección inmunohistoquímica (IHQ) de RFCE previamente a la hibridación *in situ* (ISH) de RFCE. Los portaobjetos se desparafinaron utilizando EZ Prep (nº

de catálogo 950-102) en BenchMark XT. A continuación, los portaobjetos se sometieron a pretratamiento térmico utilizando acondicionador celular 1 (nº de catálogo 950-124) previamente a la incubación de anticuerpos. Se dispensó anticuerpo E746-A750 del sobre los portaobjetos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras lavar los portaobjetos con tampón de reacción, se aplicó anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con FA y se incubaron durante 16 minutos a 37°C. Se llevó a cabo el revelado de color con naftol y azul Fast. A continuación, los portaobjetos se calentaron para inactivar los reactivos para la primera detección IHQ. Se dispensó anticuerpo específico para mutante L858R sobre los portaobjetos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras lavar los portaobjetos con tampón de reacción, se aplicó anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con FA sobre los portaobjetos y se incubaron durante 16 minutos a 37°C. Se llevó a cabo el revelado del color con naftol y rojo Fast. A continuación, se procesaron los portaobjetos para pretratamiento térmico con tampón de reacción y se digirieron con proteasa 3 de ISH (nº de catálogo 780-4149). Se aplicó sonda de RFCE a las secciones de tejidos y se hibridaron durante 5 horas tras la etapa de codesnaturalización de sonda y diana. Se llevaron a cabo etapas de lavado de astringencia con SSC (nº de catálogo 950-110) y se incubaron secciones de tejidos con anticuerpo monoclonal de conejo anti-DNP (nº de catálogo 780-4335). A continuación, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante y se llevó a cabo el revelado del color con el kit de SISH ultraView (nº de catálogo 780-002). Las secciones de tejido se contratiñeron con hematoxilina-II (nº de catálogo 790-2208) y reactivo azulante (nº de catálogo 760-2037).

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar el estado de RFCE de una muestra de tejido, que comprende:
 - 5 procesar dicha muestra de tejido con reactivos para producir señales distinguibles correspondientes a la presencia o ausencia de una mutación L858R de RFCE, de una mutación de RFCE por delección del exón 19 y de la amplificación del gen *RFCE*, y visualizar simultáneamente dichas señales distinguibles.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de tejido se obtiene a partir de un sujeto que se sospecha que presenta cáncer, de un sujeto diagnosticado de cáncer o de un sujeto que sufre de cáncer.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho procesamiento comprende poner en contacto dicha muestra con moléculas de unión a antígeno específicas para moléculas de RFCE que comprenden la mutación L858R y/o la mutación por delección del exón 19.
 - 15 4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho procesamiento comprende además poner en contacto dicha muestra con sondas de ácidos nucleicos específicas para el gen *RFCE*.
 - 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho procesamiento comprende además poner en contacto dichas moléculas de unión a antígeno específicas para moléculas de RFCE que comprenden la mutación L858R y/o la mutación por delección del exón 19 y dicha sonda de ácidos nucleicos específica para el gen *RFCE* con reactivos que producen una señal detectable correspondiente a la presencia o ausencia de dicha mutación L858R de RFCE y/o por delección del exón 19 y la presencia o ausencia de amplificación del gen *RFCE*.
 - 25 6. Método según la reivindicación 5, en el que dichas moléculas de unión a antígeno específicas para moléculas de RFCE que comprenden la mutación L858R y/o por delección del exón 19 y dicha sonda de ácidos nucleicos específica para el gen *RFCE* comprenden una fracción generadora de señales.
 - 30 7. Método según la reivindicación 5, en el que dichas moléculas de unión a antígeno específicas para moléculas de RFCE que comprenden la mutación L858R y/o la mutación por delección del exón 19 y dicha sonda de ácidos nucleicos específica para RFCE se detectan con sistemas generadores de señales.
 - 35 8. Método según la reivindicación 7, en el que dichos sistemas generadores de señales comprenden reactivos para la detección diferencial de dichas moléculas de unión a antígeno específicas para moléculas de RFCE que comprenden la mutación L858R y/o la mutación por delección del exón 19 y dicha sonda de ácidos nucleicos específica para RFCE.
 - 40 9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho sistema generador de señales comprende reactivos para generar diferentes señales colorimétricas para cada una de dichas moléculas de unión a antígeno específicas para moléculas de RFCE que comprenden la mutación L858R y/o la mutación por delección del exón 19 y dicha sonda de ácidos nucleicos específica para RFCE.
 - 45 10. Método según la reivindicación 9, en el que dichos reactivos para generar diferentes señales colorimétricas se seleccionan de entre el grupo que consiste de plata, rojo Fast, azul Fast, dorado Fast, DAB, naranja AP y azul AP.
 - 50 11. Método según la reivindicación 9, en el que dichos reactivos para generar diferentes señales colorimétricas comprenden reactivos marcados enzimáticamente.
 - 55 12. Método según la reivindicación 11, en el que los marcajes enzimáticos de dichos reactivos marcados enzimáticamente se seleccionan de entre el grupo que consiste de peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa y β -lactamasa.
 - 60 13. Método según la reivindicación 1, que comprende además: evaluar los cambios en el número de copia del gen *RFCE* y la presencia o la ausencia de mutaciones de RFCE.
 - 65 14. Método según la reivindicación 13, que comprende además utilizar dicha evaluación para realizar un diagnóstico o pronóstico para el paciente.
 15. Método según la reivindicación 13, que comprende además utilizar dicha evaluación para determinar un tratamiento terapéutico.
 16. Kit que comprende:

- una primera molécula de unión a antígeno específica para moléculas de RFCE que comprende una mutación L858R,
una segunda molécula de unión a antígeno específica para moléculas de RFCE que comprende una mutación por delección del exón 19,
- 5 una sonda de ácidos nucleicos específica para RFCE,
y reactivos distinguibles generadores de señales específicos para cada una de dicha primera molécula de unión a antígeno, dicha segunda molécula de unión a antígeno y dicha sonda de ácidos nucleicos.

FIGURA 1

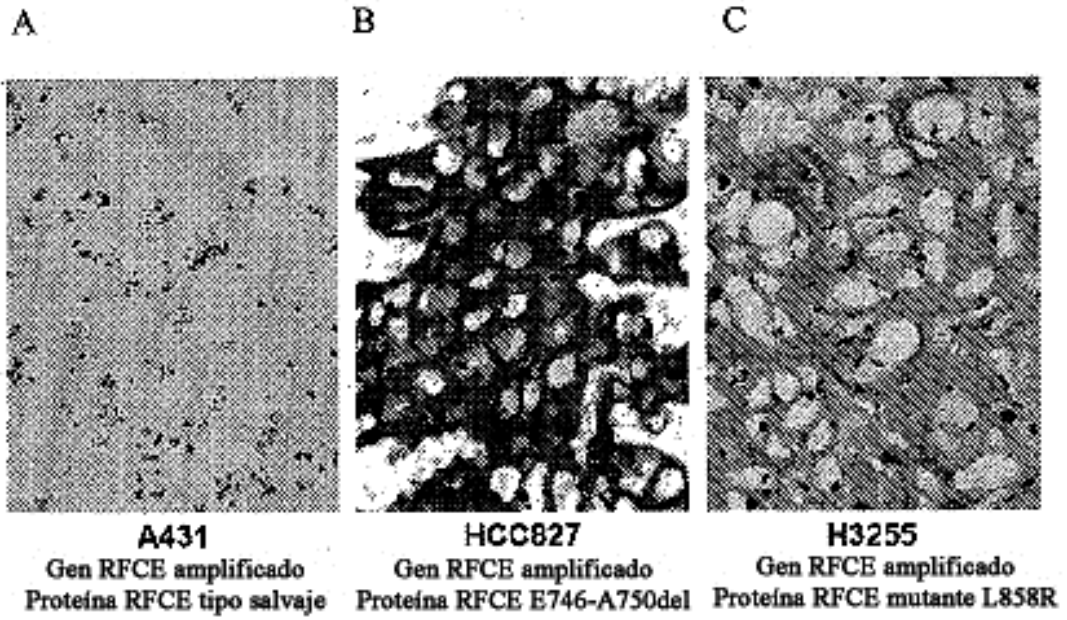


FIGURA 2

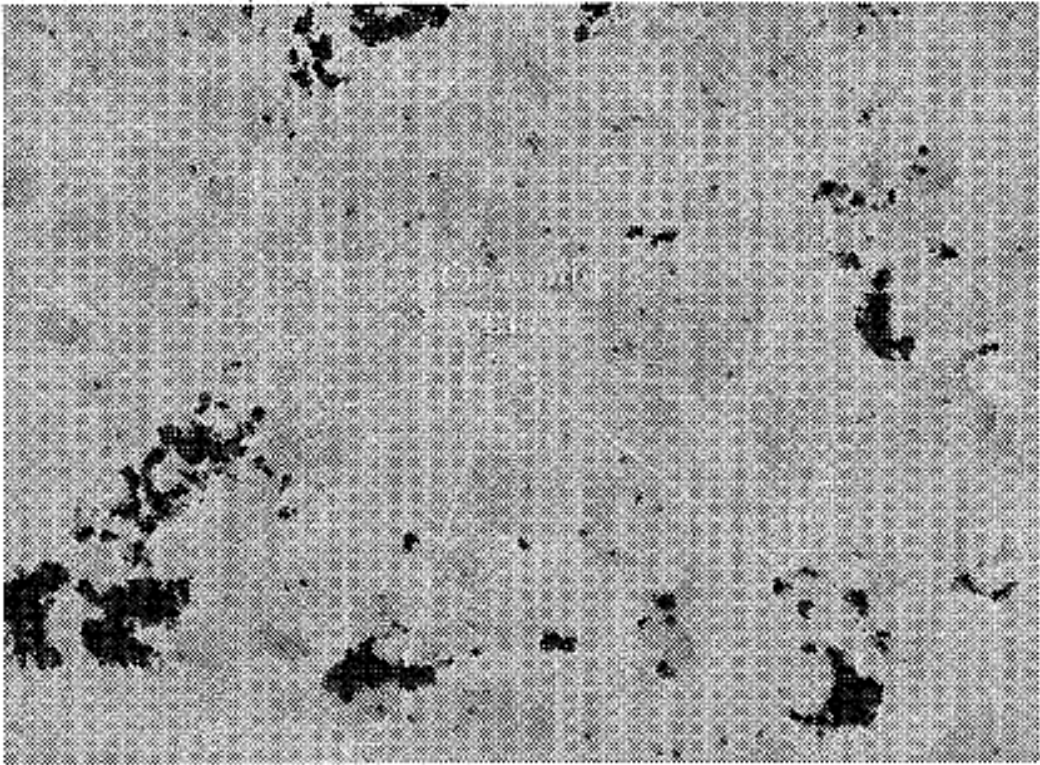


FIGURA 3

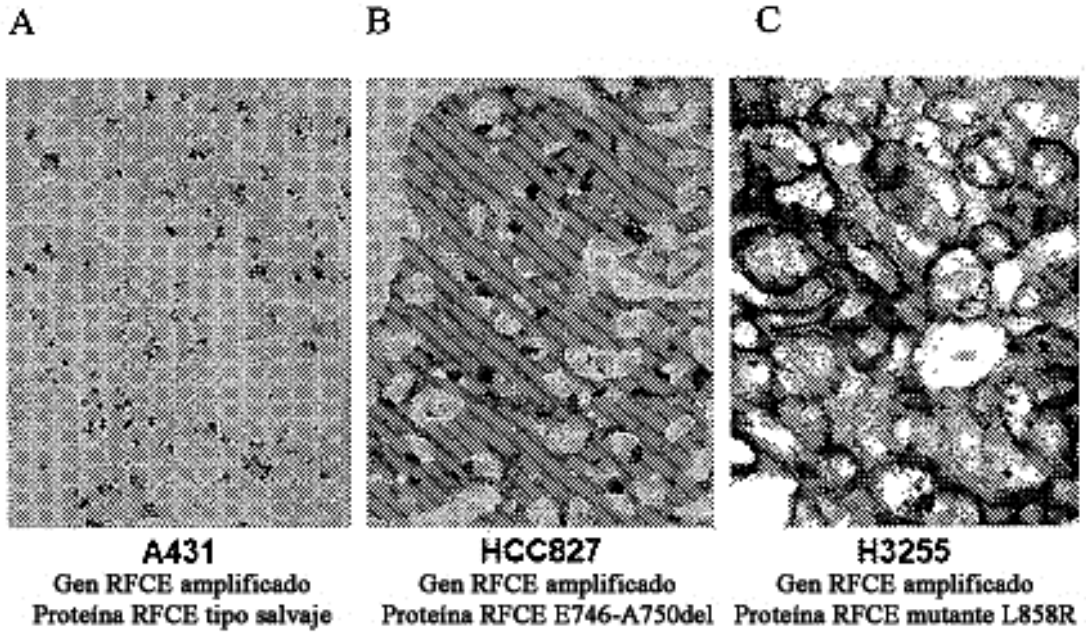


FIGURA 4

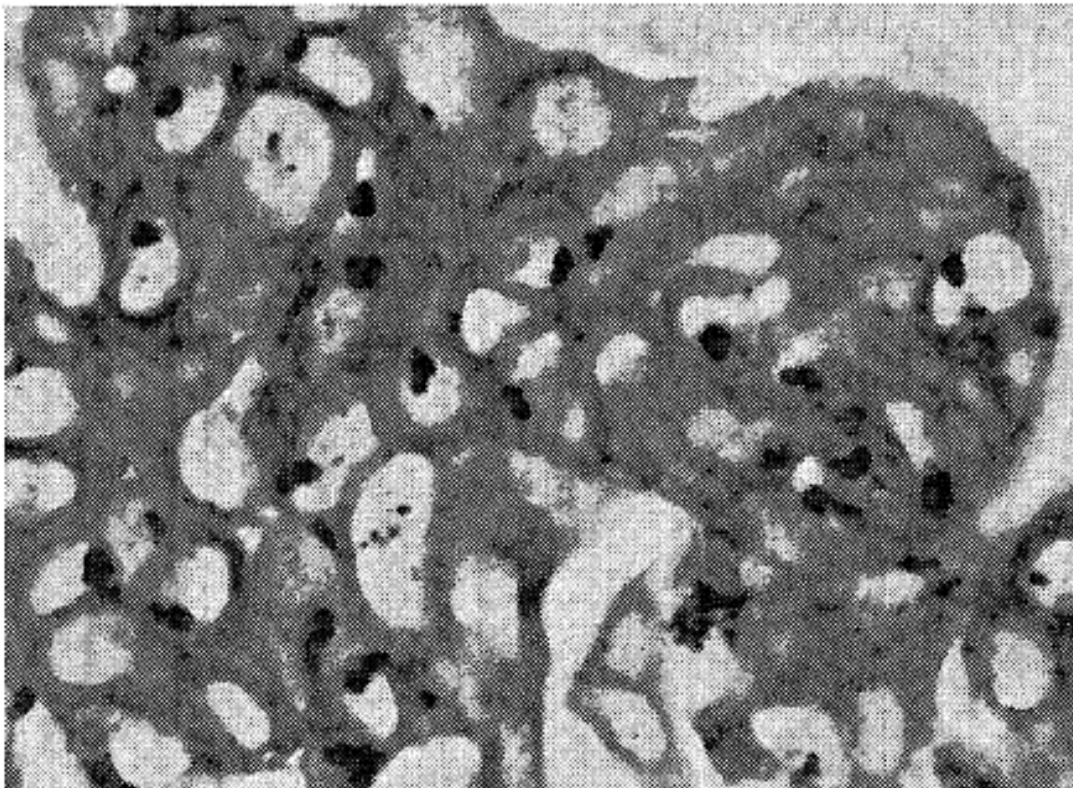


FIGURA 5

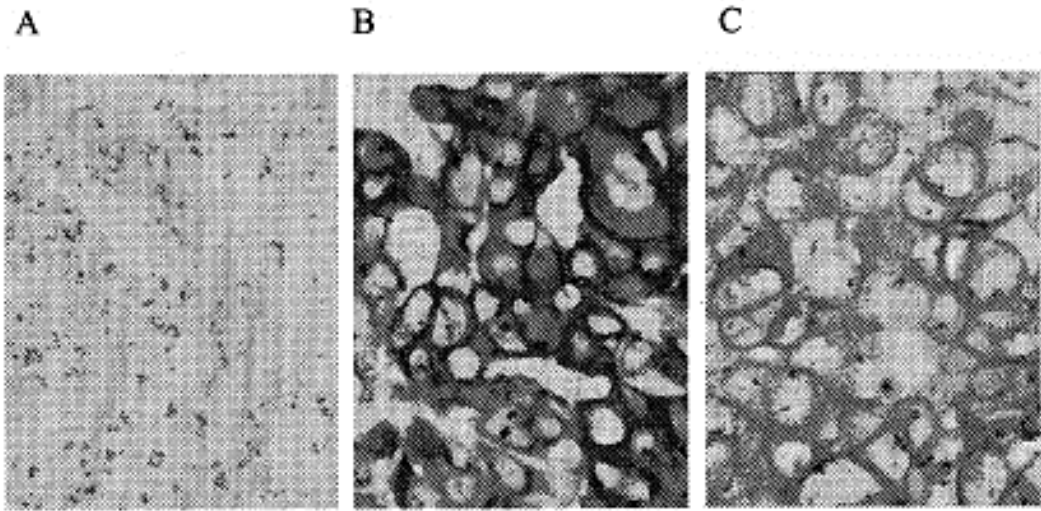


FIGURA 6

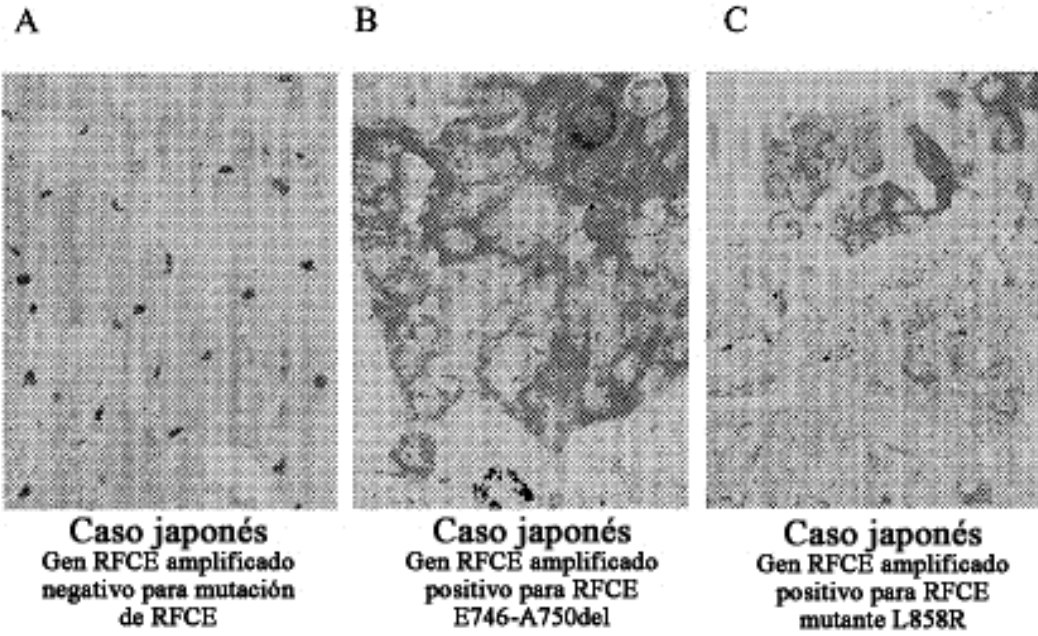
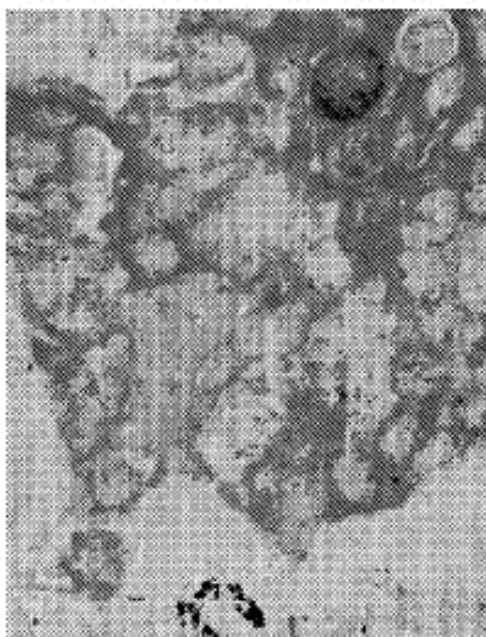


FIGURA 7

A



B

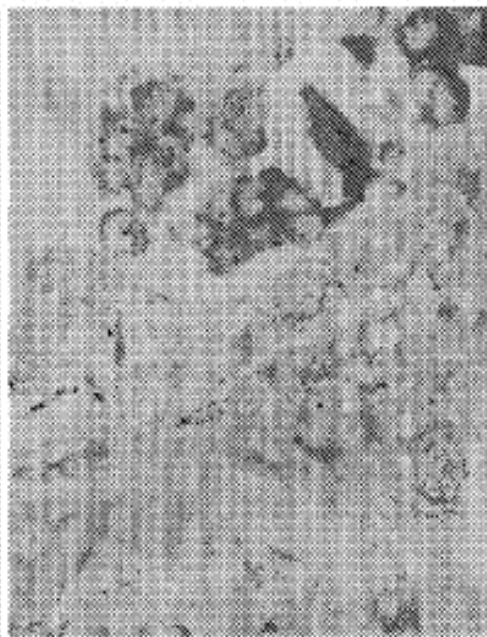


FIGURA 8

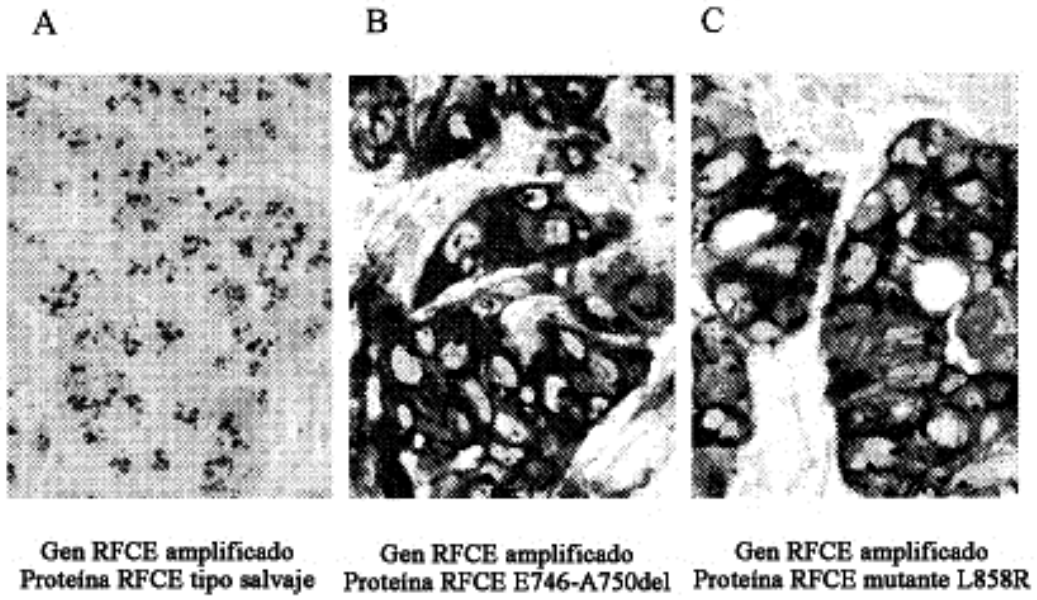


FIGURA 9

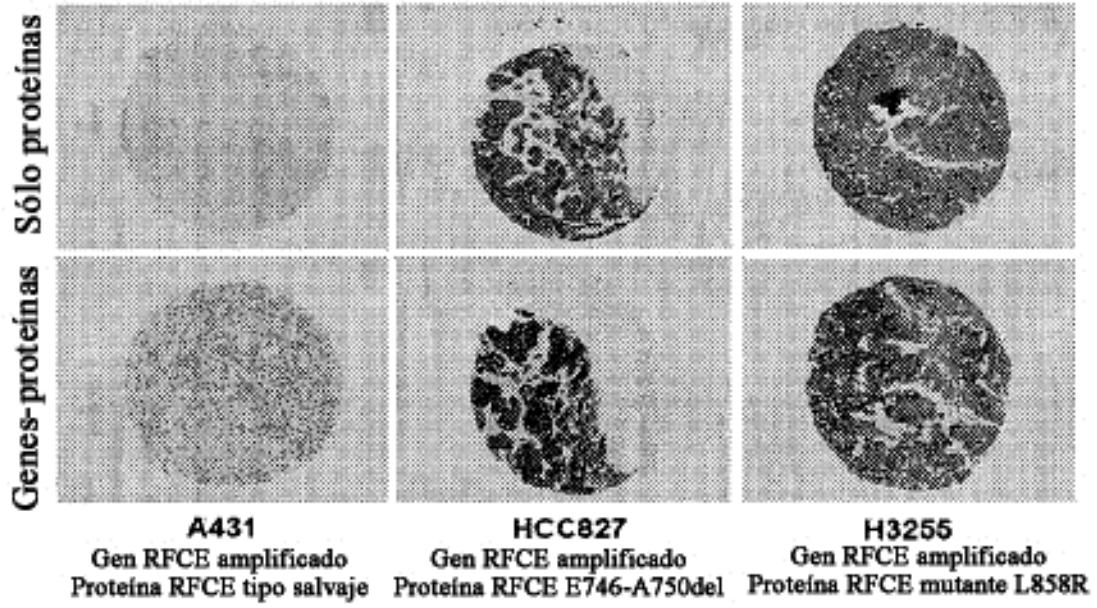


FIGURA 10

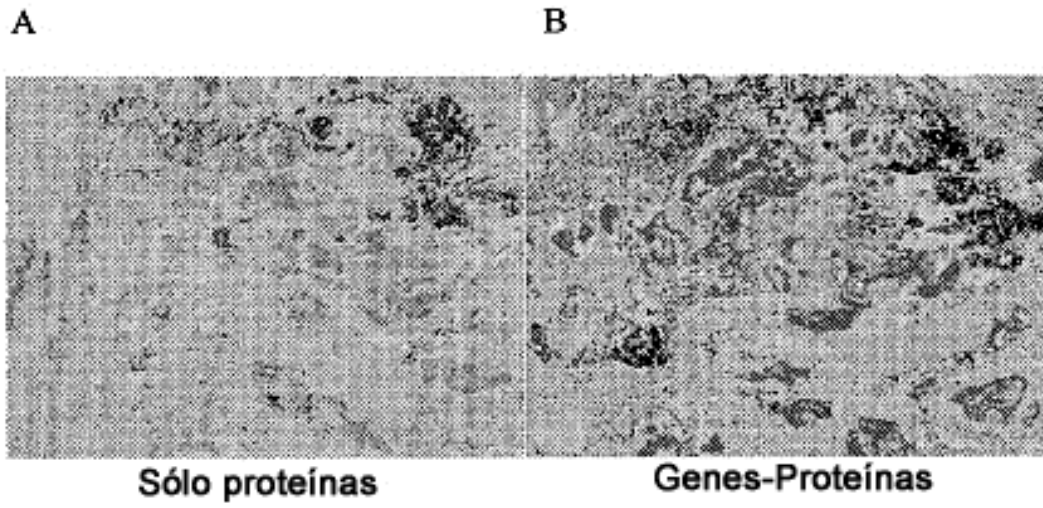


FIGURA 11

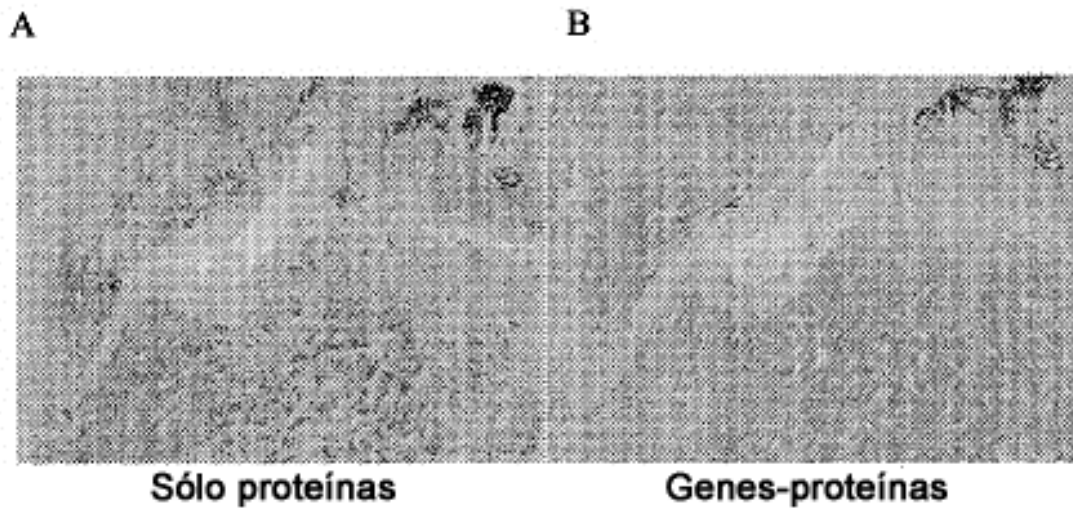


FIGURA 12

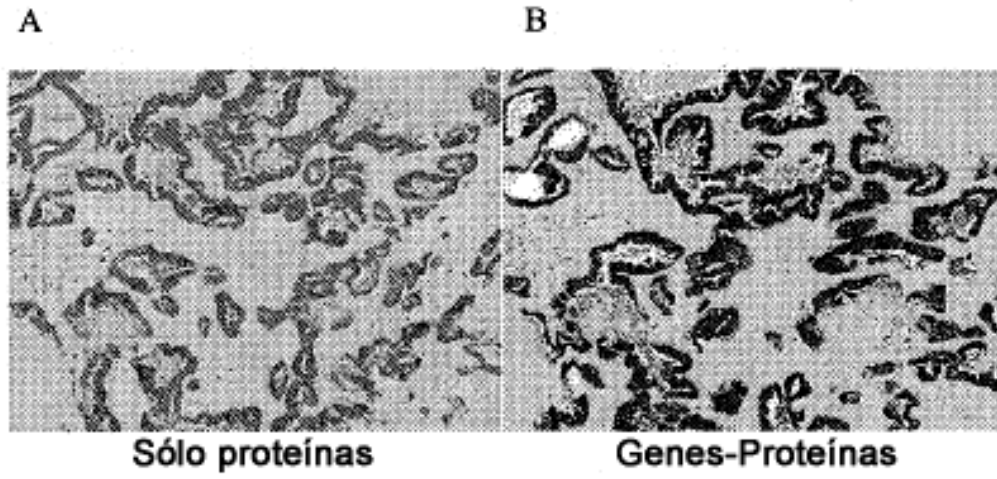


FIGURA 13

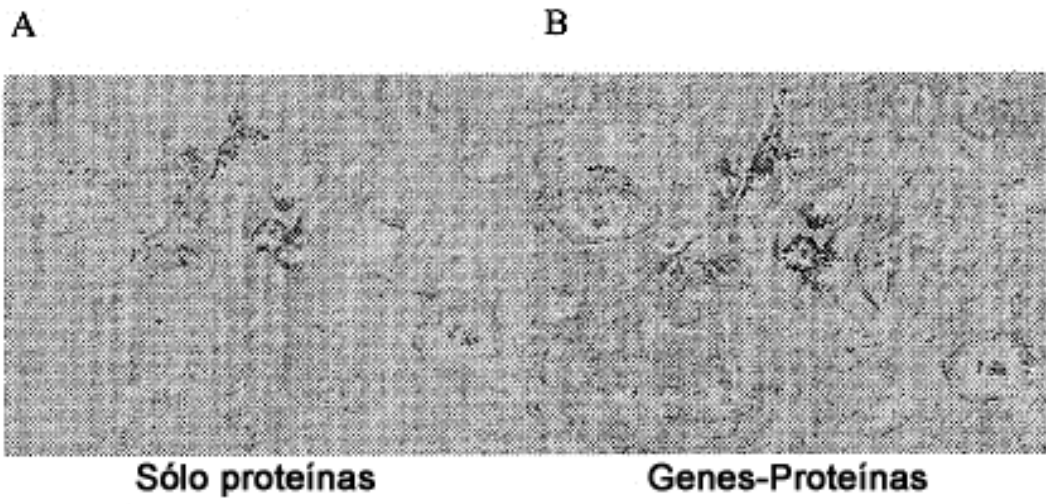


FIGURA 14

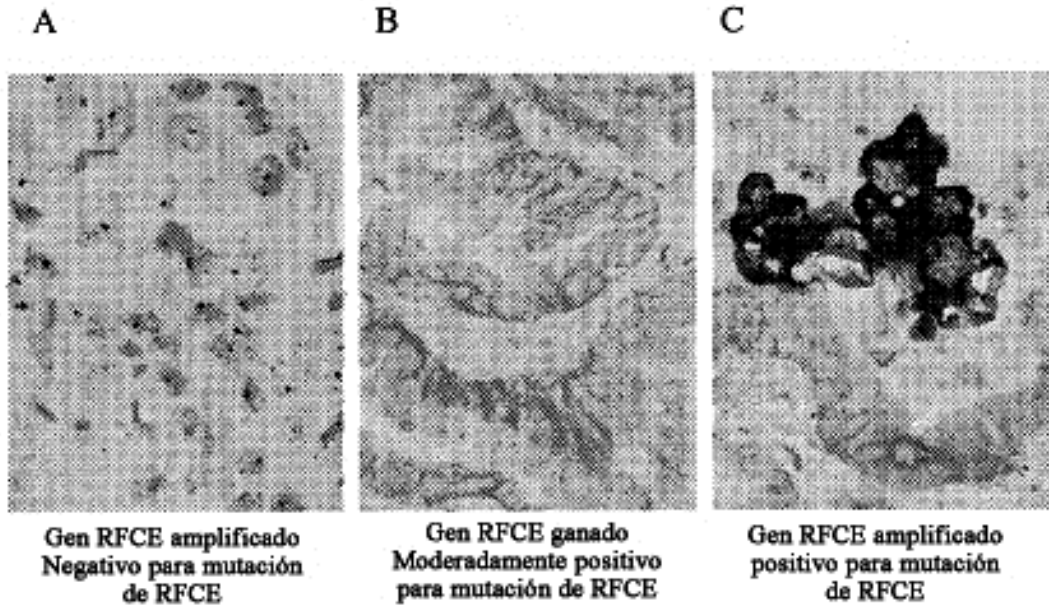


FIGURA 15

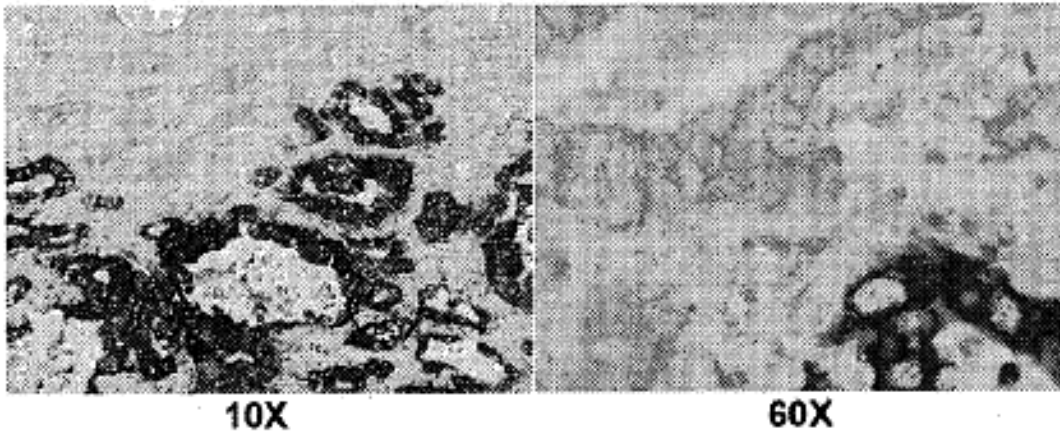


FIGURA 16

