

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 127**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2005 E 12192359 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2592155**

54 Título: **Mutaciones en EGFR**

30 Prioridad:

**04.06.2004 US 577425 P**

**10.12.2004 US 635344 P**

**28.03.2005 US 666068 P**

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

**18.03.2016**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**

**1 DNA Way**

**South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**SESHAGIRI, SOMASEKAR**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 564 127 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Mutaciones en EGFR

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a diagnóstico y terapias del cáncer y en particular a la detección de mutaciones que son de diagnóstico y/o pronóstico.

10 **Antecedentes de la invención**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro de la familia de tirosina quinasa tipo 1 de receptores del factor de crecimiento, que desempeñan papeles críticos en el crecimiento, diferenciación, y supervivencia celular. La activación de estos receptores normalmente sucede mediante unión de ligando específico, provocando hetero- u homodimerización entre miembros de la familia del receptor, con posterior autofosforilación del dominio tirosina quinasa. Esta activación desencadena una cascada de rutas de señalización intracelular implicadas tanto en la proliferación celular (la ruta de ras/raf/MAP quinasa) y supervivencia celular (la ruta de PI3 quinasa/Akt). Los miembros de esta familia, incluyendo EGFR y HER2, se han implicado directamente en la transformación celular.

Varias neoplasias humanas están asociadas a expresión aberrante o sobre-expresión de EGFR y/o sobre-expresión de sus ligandos específicos, por ejemplo, el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (Gullick, Br Med Bull 1991, 47:87-98; Modijtahedi y Dean, Int J Oncol 1994, 4:277-96; Salomon et al., Crit Rev Oncol Hematol 1995; 19:183-232). La sobre-expresión de EGFR se ha asociado a un pronóstico adverso en varios cánceres humanos, incluyendo NSCLC.

En algunos casos, la sobre-expresión de EGFR tumoral se ha correlacionado tanto con quimio-resistencia como a un mal pronóstico (Lei et al., Anticancer Res 1999; 19:221-8; Veale et al., Br J Cancer 1993; 68:162-5). Estas observaciones sugieren que agentes que inhiban de forma eficaz la activación del receptor EGFR y la posterior señalización corriente abajo pueden tener actividad clínica en varios cánceres humanos, incluyendo NSCLC.

Tarceva™ (también conocido como erlotinib; OSI-774), una quinazolina, es un potente inhibidor selectivo oralmente activo de tirosina quinasa EGFR. Erlotinib inhibe la tirosina quinasa de EGFR humano con una  $CI_{50}$  de 2 nM (0,786 mg/ml) en un ensayo enzimático in vitro. Esta inhibición es selectiva para la tirosina quinasa de EGFR, provoca detención del ciclo celular en  $G_1$ , y es reversible. La administración oral de erlotinib en ratones ha demostrado una reducción de >70 % en la autofosforilación de EGFR en xenoinjertos humanos y ha demostrado inhibición marcada del crecimiento de xenoinjertos HN5 y A431 en ratones desnudos. Además de la actividad de agente individual en sistemas de ensayo in vivo, erlotinib se ha evaluado en combinación con varios agentes quimioterapéuticos para determinar posibles interacciones. Hubo una interacción aditiva entre erlotinib y paclitaxel, cisplatino, gemcitabina y doxorubicina.

El cáncer pulmonar representa la causa principal de mortalidad relacionada con cáncer tanto para hombres como para mujeres en los Estados Unidos. En 2000, se estimó que se diagnosticarían 164.000 nuevos casos y 157.000 pacientes morirían de esta enfermedad (Greenlee et al., CA Cancer J Clin 2001, 51:15-36). Aproximadamente el 75 % de estos pacientes habría tenido histologías de células no microcíticas, presentando la mayoría enfermedad inoperable en Fase IIIB o Fase IV. Para aquellos pacientes con enfermedad más limitada en la presentación (Fases I-III A), la recidiva que sigue a la terapia quirúrgica convencional, con o sin quimio- y/o radioterapia adyuvante o neoadyuvante, es habitual. Estos hallazgos producen una supervivencia global de 5 años en cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) de ~ 12 % y sirven para enfatizar la necesidad médica insatisfecha en esta enfermedad.

El compuesto de platino cisplatino fue el primer agente quimioterapéutico en mostrar beneficio clínico en el tratamiento de NSCLC localmente avanzado o metastásico. Ensayos clínicos aleatorizados demostraron mejoras en las tasas de respuesta, calidad de vida, y supervivencia en comparación con los mejores cuidados de apoyo (Rapp et al. 1988). Sin embargo, la magnitud de esta mejora fue modesta-moderada en semanas. Posteriormente, se han evaluado varios agentes quimioterapéuticos más nuevos como agentes individuales y en combinación con las sales de platino en el escenario de primera línea. La conclusión de estos estudios es que la quimioterapia moderna "doble" parece conseguir tasas de respuesta del 15 %-20 %, un tiempo medio hasta progresión de la enfermedad de 3-4 meses, y una supervivencia media de 7-8 meses. Las mejoras moderadas en la eficacia con terapias de combinación sobre los resultados obtenidos con cisplatino han establecido estas terapias como norma asistencial para pacientes con NSCLC avanzado y un aceptable estado funcional (Non-Small Cell Lung Cancer Cooperative Group, Br Med J 1995, 311:899-909; American Society of Clinical Oncology, J Clin Oncol 1997, 15:2996-3018; Breathnach et al., J Clin Oncol 2001; 19:1734-42).

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona métodos, como se define en las reivindicaciones, para determinar el pronóstico de un paciente que tiene un tumor de cáncer pulmonar no microcítico.

La presente invención también proporciona métodos, como se define en las reivindicaciones, para identificar un

tumor de cáncer pulmonar no microcítico que es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR.

La presente invención también proporciona un inhibidor de EGFR seleccionado entre el grupo que consiste en cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib, para uso en un método de tratamiento de tumor de cáncer pulmonar no microcítico en un paciente humano, como se define en las reivindicaciones.

La presente descripción proporciona un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible a tratamiento, que comprende determinar la presencia de un gen EGFR mutado o una proteína EGFR mutada en una muestra de dicho tumor donde dicha mutación está localizada en los exones 18-21 de EGFR mediante lo cual la presencia de un gen EGFR mutado o proteína EGFR mutada indica que el tumor es susceptible a tratamiento.

También se describe un método para tratar un tumor en un mamífero, que comprende identificar la presencia de una mutación EGFR en dicho tumor y tratar a dicho mamífero con un agente antineoplásico.

También se describe un método para identificar una mutación EGFR en una muestra, que comprende poner en contacto el ácido nucleico de dicha muestra con una sonda que es capaz de hibridar específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada, o fragmento de la misma que incorpora una mutación, y detectar la hibridación.

También se describen sondas de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con un ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada o fragmento de la misma que incorpora una mutación.

También se describe un método para detectar un gen EGFR mutado en una muestra, que comprende amplificar a partir de dicha muestra, el ácido nucleico correspondiente al dominio quinasa de dicho gen EGFR, o un fragmento del mismo sospechoso de contener una mutación, y comparar la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del correspondiente gen EGFR de tipo silvestre o fragmento del mismo.

También se describe un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR, que comprende (i) determinar la presencia de una proteína o gen KRAS de tipo silvestre en una muestra de dicho tumor mediante lo cual la presencia de una proteína o gen KRAS de tipo silvestre indica que el tumor es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR o (ii) determinar la presencia de una proteína o gen KRAS mutado en una muestra de dicho tumor mediante lo cual la ausencia de una proteína o gen KRAS mutado indica que el tumor es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra la secuencia de amino ácidos de EGFR1 de tipo silvestre (SEC ID N.º 1) en que la secuencia señal es los restos 1-24, el dominio extracelular incluye los restos 24-645, el dominio transmembrana incluye los restos 646-668, y el dominio citoplasmático incluye los restos 669-1210. La región de dominio tirosina quinasa es los restos 718-964, y el sitio de fosforilación de treonina es el resto 678.

La Figura 2a a 2d es la secuencia de ADNc (SEC ID N.º 2) de EGFR de tipo silvestre en que el exón 18 corresponde a los nucleótidos 2308-2430; el exón 19 corresponde a los nucleótidos 2431-2529; el exón 20 corresponde a los nucleótidos 2530-2715 y el exón 21 corresponde a 2716-2871.

La Figura 3 es una representación gráfica de las regiones extracelular (parte superior) e intracelular (parte inferior) de EGFR.

La Figura 4 es una curva de Kaplan-Meier que muestra el tiempo hasta la progresión de pacientes que tienen tumores NSCLC que expresan EGFR de tipo silvestre (línea continua) y EGFR mutante (línea discontinua).

La Figura 5 es una curva de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de pacientes que tienen tumores NSCLC que expresan EGFR de tipo silvestre (línea continua) y EGFR mutante (línea discontinua).

La Figura 6 es una autorradiografía que ilustra la inhibición de la autofosforilación de EGFR de tipo silvestre, y EGFR mutante (L858R y del746-752) con concentraciones variables de erlotinib en células COS7 transfectadas de forma transitoria.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la inhibición de la autofosforilación de EGFR de tipo silvestre y EGFR mutante (L858R y del746-752) con concentraciones variables de erlotinib en células COS7 transfectadas de forma transitoria.

La Figura 8 ilustra mutaciones en los exones 18 y 19 de las secuencias génica y proteica de EGFR. Los cambios de aminoácido y nucleótido, y las inserciones, están en fuente negrita, subrayada mientras que las deleciones se muestran como guiones (-).

La Figura 9 ilustra mutaciones en los exones 20 y 21 de las secuencias génica y proteica de EGFR. Los cambios

de aminoácido y nucleótido, y las inserciones, están en fuente negrita, subrayada mientras que las deleciones se muestran como guiones (-).

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

5 Un descubrimiento de la presente invención es que suceden eventos mutacionales asociados a tumorigénesis en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Aunque se ha sabido previamente que actividad aberrante de EGFR estaba asociada a diversos cánceres, se desconocía que existían mutaciones en la región del dominio quinasa de EGFR (KDR) que causaban actividad aberrante de señalización asociada a algunos cánceres. 10 Sorprendentemente, pacientes que padecen tumores que tienen mutaciones en la KDR de EGFR tienen un mejor pronóstico que aquellos con EGFR de tipo silvestre. Las mutaciones en KDR del gen EGFR pueden implicar reordenamientos tales como inserciones y deleciones así como mutaciones puntuales.

15 Se secuenciaron muestras de aproximadamente 250 pacientes que participaron en un ensayo clínico en fase III doble ciego, aleatorizado mencionado como Tribute, para mutaciones que existen en los exones 18-21 de EGFR. Tribute estudió 1.079 pacientes en aproximadamente 150 centros en los Estados Unidos que tenían NSCLC confirmado de forma histológica que no habían recibido quimioterapia previa, comparando erlotinib + quimioterapia (carboplatino/paclitaxel) con quimioterapia en solitario. Los pacientes recibieron paclitaxel (200 mg/m<sup>2</sup> en infusión i.v. de 3 horas) seguido por carboplatino (AUC = 6 mg/ml x minuto infundido en 15-30 minutos usando la fórmula de Calvert) con o sin erlotinib (100 mg/día p.o. en escala hasta 150 mg/día para pacientes tolerantes). Las muestras de tumor, los bloques integrados en parafina fijados con formalina o portaobjetos sin teñir, de aproximadamente 250 20 pacientes, recogidas del ensayo Tribute, se enriquecieron para células tumorales por micro-disección con captura láser seguida por extracción de ADN. Se amplificaron los exones 18-21 por PCR anidada y se obtuvieron secuencias bidireccionales de cada producto de PCR usando química con terminador de colorante fluorescente. Las mutaciones descubiertas a partir de la secuenciación se muestran en la tabla 1:

Tabla 1

| mutación en la proteína | mutación en el ácido nucleico                 | exón |
|-------------------------|---|------|
| G719A                   | 2402G>C                                       | 18   |
| G719C                   | 2401G>T                                       | 18   |
| G719S                   | 2401G>A                                       | 18   |
| E746-R748 del           | 2482-2490 del GGAATTAAGA (SEC ID N.º 32)      | 19   |
| E746-A750 del           | 2481-2495 del GGAATTAAGAGAAGC (SEC ID N.º 33) | 19   |
| E746-R748 del           | 2482-2490 del GAATTAAGA                       |      |
| E749Q                   | 2491G>C                                       |      |
| A750P                   | 2494G>C                                       | 19   |
| L747-E749 del           | 2485-2493 del TTAAGAGAA                       |      |
| A750P                   | 494G>C  | 19   |
| L747S                   | 2486-2503 del TAAGAGAAGCAACATCTC              |      |
| R748-P753 del           | (SEC ID N.º 34)                               | 19   |
| L747-S752 del           | 2485-2502 del TTAAGAGAAGCAACATCT              |      |
| E746V                   | 2483A>T                                       | 19   |
| L747-T751 del ins S     | 2486-2494del TAAGAGAAGCAA (SEC ID N.º 36)     | 19   |
|                         | 2499-2522 del ATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAAT        | 19   |
| S752-I759 del           | (SEC ID N.º 37)                               |      |
| M766-A767 Al ins        | 2544-2545 ins GCCATA                          | 20   |
| S768-V769 SVA ins       | 2554-2555 ins CCAGCGTGG (2556C>T silenciosa)  | 20   |
| L858R                   | 2819T>G                                       | 21   |
| G719C                   | 2401G>T                                       | 18   |
| S768I                   | 2549G>T {2607G>A SNP silenciosa}              | 20   |
| G719C                   | 2401G>T                                       | 18   |
| V765M                   | 2539G>A                                       | 20   |
| S768I                   | 2549G>T                                       | 20   |
| A755V                   | 2510C>T                                       | 19   |
| L747S                   | 2486T>C                                       | 19   |
| E746K                   | 2482G>A                                       | 19   |
| S752-I759 del           | (SEC ID N.º 37)                               |      |

|                               |                      |    |
|-------------------------------|----------------------|----|
| P772-H773 V ins               | 2561-2562 ins GGT    | 20 |
| L858P                         | 2819T>C              | 21 |
| L861Q                         | 2576T>A              | 21 |
| P772-H773 NS ins              | 2562-2563 ins AACTCC | 20 |
| H773Y                         | 2563C>T              |    |
| T790M                         | 2615C>T              | 20 |
| L858R                         | 2819T>G              | 21 |
| S784F                         |                      | 21 |
| L858R                         |                      | 21 |
| ins= inserción del= delección |                      |    |

La numeración de nucleótidos para las mutaciones se basa en la secuencia de referencia mostrada en las figuras 2a-2d.

- 5 El resultado clínico de pacientes que tienen tumores con mutaciones EGFR y EGFR de tipo silvestre se analizaron de acuerdo con el beneficio (respuesta + enfermedad estable) de respuesta (completa + parcial) y enfermedad progresiva. Se evaluaron las lesiones usando los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) por los cuales "respuesta completa" (CR) se define como la desaparición de todas las lesiones diana; "respuesta parcial" (PR) se define como al menos un 30 % de disminución en la suma del diámetro más largo de las lesiones diana, tomando como referencia la suma del diámetro más largo basal; "enfermedad progresiva" (PD) se define como al menos un 20 % de aumento en la suma del diámetro más largo de las lesiones diana, tomando como referencia la suma del diámetro más largo más pequeña registrada desde que empezó el tratamiento o la aparición de una o más nuevas lesiones; y "enfermedad estable" (SD) se define como ni encogimiento suficiente para reunir los requisitos para respuesta parcial ni suficiente aumento para reunir los requisitos para enfermedad progresiva, tomando como referencia la suma del diámetro más largo más pequeña desde que empezó el tratamiento.

Los resultados del análisis se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

|  | EGFR mutante<br>n=24 |      | EGFR de tipo silvestre<br>n=181 |      |
|--|----------------------|------|---------------------------------|------|
| Tasa de Respuesta/Beneficio  |                      |      |                                 |      |
| respuesta (CR + PR)  | 11                   | 46 % | 46                              | 25 % |
| beneficio (CR + PR + SD)   | 18                   | 75 % | 105                             | 58 % |
| SD   | 7                    | 29 % | 59                              | 33 % |
| PD   | 6                    | 25 % | 76                              | 42 % |
| Supervivencia (días)   |                      |      |                                 |      |
| median   | 435                  |      | 309                             |      |
| intervalo  | 133-687              |      | 9-643                           |      |
| CR= respuesta completa; PR= respuesta parcial; SD= enfermedad estable; PD= enfermedad progresiva |                      |      |                                 |      |

- 20 El análisis del resultado clínico reveló que pacientes con tumores que expresan una mutación en los exones 18-21 de EGFR tienen mejor pronóstico que aquellos con tumores que expresan EGFR de tipo silvestre. Los pacientes con EGFR mutante mostraron mayor tasa de respuesta, tasa de beneficio y supervivencia cuando se trataban con quimioterapia o quimioterapia más erlotinib. Estos resultados son útiles para predecir el resultado ya que pacientes cuyos tumores tienen mutaciones EGFR en cualquiera o todos los exones 18 a 21 tienen pronóstico más favorable que pacientes cuyos tumores no tienen dichas mutaciones.

- 30 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método definido en las reivindicaciones para determinar el pronóstico de un paciente que tiene un tumor, que comprende determinar en una muestra de dicho tumor la presencia o ausencia de una o más mutaciones EGFR en los exones 18-21 (o la secuencia de aminoácidos correspondiente a los exones 18-21) mediante lo cual la presencia de dicha una o más mutaciones EGFR indica mejor pronóstico en comparación con la ausencia de dicha una o más mutaciones EGFR. Por "pronóstico" se entiende respuesta y/o beneficio y/o supervivencia. Por "mutaciones EGFR" se entiende una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico que difiere de la proteína o ácido nucleico de EGFR de tipo silvestre respectivamente encontrada en un alelo (heterocigoto) o ambos alelos (homocigoto) y puede ser somática o de la línea germinal. La mutación es E746K, L747S, o A755V.

Se secuenciaron los exones de EGFR 18-21 de una línea de células tumorales H1975 que mostraba resistencia a tratamiento con erlotinib y se descubrió que incorporaban una mutación T790M en combinación con una mutación

L858R. Por consiguiente, la presente descripción proporciona adicionalmente un método para determinar el pronóstico de un paciente que tiene un tumor, que comprende determinar en una muestra de dicho tumor la presencia o ausencia de la mutación de EGFR T790M mediante lo cual la presencia de dicha mutación de EGFR T790M indica peor pronóstico en comparación con la ausencia de dicha mutación de EGFR T790M. Además, se proporcionó un método para identificar pacientes que tienen un tumor que es menos sensible a terapia de un inhibidor de EGFR tal como erlotinib o gefitinib, sea en combinación con quimioterapia o no, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de EGFR T790M en el tumor del paciente mediante lo cual la presencia de dicha mutación indica que el paciente responderá menos a dicha terapia en comparación con un paciente que tiene un tumor que no tiene dicha mutación de EGFR T790M. Además, se proporcionó un método para identificar un tumor que es resistente a tratamiento con un inhibidor de EGFR, tal como un inhibidor de la unión del dominio quinasa (por ejemplo, erlotinib o gefitinib), sea en combinación con quimioterapia o no, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de EGFR T790M en una muestra del tumor mediante lo cual la presencia de dicha mutación indica que el tumor es resistente a dicho tratamiento. Se entiende que la determinación de la mutación es a nivel proteico o nivel de ácido nucleico (ADN genómico o ARNm) y se consiguió usando técnicas tales como las descritas en este documento. En una realización particular, dicho inhibidor de EGFR compete con ATP en el dominio quinasa de EGFR. En una realización particular, el inhibidor de EGFR es erlotinib.

En otro aspecto, se proporcionó un método para tratar a un paciente que tienen un tumor que incorpora una proteína o gen EGFR mutante T790M (o para tratar un tumor que incorpora una proteína o gen EGFR mutante T790M), que comprende co-administrar a dicho paciente (o poner contacto dicho tumor con) un primer compuesto que se une a y/o inhibe la señalización de dicho EGFR mutante T790M en combinación con un segundo compuesto que se une a y/o inhibe la señalización de EGFR de tipo silvestre o EGFR que incorpora una mutación activadora. En una realización particular, dicha mutación activadora es una o más de las descritas en la Tabla 1 (diferentes a T790M). En una realización particular, dichos primer y segundo compuestos se administran de forma secuencial o concomitante. En una realización particular, dicho segundo compuesto es erlotinib.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para seleccionar compuestos que inhiben la señalización de una proteína EGFR mutante que incorpora una mutación T790M, que comprende poner en contacto dicho EGFR mutante con un compuesto de ensayo en presencia de un sustrato de fosforilación y ATP y detectar un cambio en la cantidad de fosforilación de dicho sustrato mediante lo cual una reducción de fosforilación de dicho sustrato en comparación con un control, o en comparación con la fosforilación del sustrato en ausencia del compuesto de ensayo, indica que dicho compuesto de ensayo es un inhibidor de la señalización de EGFR mutante. En una realización, dicho método se realiza in vitro en presencia de un ligando para dicho EGFR mutante tal como EGF o TGF-alfa.

En una realización particular, la actividad inhibidora de un compuesto de ensayo puede determinarse in vitro mediante la cantidad de inhibición de la fosforilación de un sustrato exógeno (por ejemplo, copolímero aleatorio Lys<sub>3</sub>-Gastrina o poliGluTyr (4:1) (I. Posner et. al., J. Biol. Chem. 267 (29), 20638-47 (1992)) en tirosina por la quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico mediante un compuesto de ensayo respecto a un control. Se pre-incuba EGFR mutante T790M humano soluble purificado (96 ng) en un tubo de microfuga con EGF (2 µg/ml) en tampón de fosforilación + vanadato (PBV: HEPES 50 mM, pH 7,4; NaCl 125 mM; MgCl<sub>2</sub> 24 mM; ortovanadato sódico 100 µM), en un volumen total de 10 µl, durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. El compuesto de ensayo, disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), se diluye en PBV, y se mezclan 10 µl con la mezcla EGFR mutante/EGF, y se incuba durante 10-30 minutos a 30 °C. La reacción de fosforilación se inicia mediante la adición de 20 µl de mezcla de <sup>33</sup>P-ATP/sustrato (Lys<sub>3</sub>-Gastrina 120 µM (secuencia en código de una letra para los aminoácidos, KKKGPWLEEEEEAYGWLDF - SEC ID N.º 38), Hepes 50 mM pH 7,4, ATP 40 µM, 2 µCi γ-[<sup>33</sup>P]-ATP) a la mezcla de EGFR mutante/EGF y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 µl de solución de detención (EDTA 0,5 M, pH 8; ATP 2 mM) y 6 µl de HCl 2N. Los tubos se centrifugan a 14.000 RPM, 4 °C, durante 10 minutos. Se pipetea 35 µl de sobrenadante de cada tubo en un círculo de 2,5 cm de papel Whatman P81, se lava abundantemente cuatro veces en ácido acético al 5 %, 1 litro por lavado, y después se seca al aire. Esto provoca la unión del sustrato al papel con pérdida de ATP libre en el lavado. El [<sup>33</sup>P] incorporado se mide por recuento de centelleo líquido. La incorporación en ausencia de sustrato (por ejemplo, Lys<sub>3</sub>-Gastrina) se sustrae de todos los valores como fondo y se calcula el porcentaje de inhibición respecto a controles sin compuesto de ensayo presente. Dichos ensayos, realizados con un intervalo de dosis de compuestos de ensayo, permiten la determinación de un valor de CI<sub>50</sub> aproximado para la inhibición in vitro de la actividad quinasa de EGFR mutante T790M.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método como se define en las reivindicaciones para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible a tratamiento, que comprende determinar la presencia de un gen EGFR mutado o proteína EGFR mutada en una muestra de dicho tumor, donde dicha mutación está localizada en los exones 18-21 de EGFR, mediante lo cual la presencia de un gen EGFR mutando proteína EGFR mutada indica que el tumor es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR. El tumor es un tumor de cáncer pulmonar no microcítico. En una realización, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo tal como Erbitux™ (cetuximab, Imclone Systems Inc.) y ABX-EGF (panitumumab, Abgenix, Inc.). En otra realización, el inhibidor de EGFR es una molécula pequeña que compete con ATP tal como Tarceva™ (erlotinib, OSI Pharmaceuticals), Iressa™ (gefitinib, Astra-Zeneca), tirfostinas descritas por Dvir, et al., J Cell Biol., 113:857-865 (1991); compuestos tricíclicos de pirimidina

descritos en la patente de Estados Unidos 5.679.683; el compuesto 6-(2,6-diclorofenil)-2-(4-(2-dietil-aminoetoxi)fenilamino)-8-metil-8H-pirido(2,3-d)pirimidin-7-ona (conocido como PD166285) descrito en Panek, et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283, 1433-1444 (1997).

5 En otro aspecto de la descripción. Se proporciona un método para identificar una mutación EGFR en una muestra, que comprende poner en contacto ácido nucleico de dicha muestra con una sonda de ácido nucleico que es capaz de hibridar específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada, o fragmento de la misma que incorpora una mutación, y detectar dicha hibridación. En una realización particular, dicha sonda se marca de forma detectable tal como con un radioisótopo (<sup>3</sup>H, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P etc.), un agente fluorescente (rodamina, fluoresceína etc.) o un agente cromogénico. En una realización particular, la sonda es un oligómero antisentido, por ejemplo PNA, morfolino-fosforamidatos, LNA o 2'-alcoialcoxi. La sonda puede ser de aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 75, de aproximadamente 15 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30. En otro aspecto, dichas sondas de la descripción se proporcionan en un kit para identificar mutaciones EGFR en una muestra, comprendiendo dicho kit un oligonucleótido que hibrida específicamente con o adyacente a un sitio de mutación en el gen EGFR. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para tratar pacientes que tienen tumores que contienen mutaciones EGFR con un inhibidor de EGFR basándose en el resultado de un ensayo de hibridación usando el kit.

20 En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para detectar un gen EGFR mutando en una muestra, que comprende amplificar dicho ácido nucleico de la muestra correspondiente al dominio quinasa de dicho gen EGFR, o los exones 18-21, o un fragmento del mismo sospechoso de contener una mutación, y comparar la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del correspondiente gen EGFR de tipo silvestre o fragmento del mismo. Una diferencia en la movilidad indica la presencia de una mutación en la secuencia de ácido nucleico amplificada. La movilidad electroforética puede determinarse en gel de poliacrilamida.

30 Como alternativa, el ácido nucleico del gen EGFR amplificado o fragmento puede analizarse para la detección de mutaciones usando detección de mutación enzimática (EMD) (Del Tito et al, *Clinical Chemistry* 44:731-739, 1998). EMD usa la endonucleasa VII resolvasa T<sub>4</sub> de bacteriófago, que explora a lo largo de ADN bicatenario hasta que detecta y escinde distorsiones estructurales causadas por desapareamiento de pares de bases que provocan mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. La detección de dos fragmentos cortos formados por escisión con resolvasa, por ejemplo por electroforesis en gel, indica la presencia de una mutación. Los beneficios del método EMD son un único protocolo para identificar mutaciones puntuales, deleciones, e inserciones ensayadas directamente a partir de reacciones de PCR, lo que elimina la necesidad de purificación de la muestra, acorta el tiempo de hibridación, y aumenta la relación señal a ruido. Pueden ensayarse mezclas mixtas que contienen hasta un exceso de 20 veces de ADN normal y fragmentos de hasta 4 kb de tamaño. Sin embargo, la exploración EMD no identifica cambios de bases particulares que existen en muestras positivas a mutación, lo que requiere procedimientos adicionales de secuenciación para identificar la mutación si fuera necesario. La enzima CEL I puede usarse de forma similar a la endonucleasa VII resolvasa T<sub>4</sub> como se demuestra en el documento US5869245.

40 Otro kit simple para detectar las mutaciones EGFR de la descripción es una tira de ensayo de hibridación inversa similar a Haemochromatosis StripAssay™ (Viennalabs <http://www.bamburghmarrsh.com/pdf/4220.pdf>) para la detección de múltiples mutaciones en genes HFE, TFR2 y FPN1 que causan hemocromatosis. Dicho ensayo se basa en hibridación específica de secuencia después de amplificación por PCR. Para ensayos de una única mutación, puede aplicarse un sistema de detección basado en microplaca, mientras que para ensayos de múltiples mutaciones, pueden usarse tiras de ensayo como "macro-series". Los kits pueden incluir reactivos listos para su uso para preparación de la muestra, amplificación y detección de mutaciones. Protocolos de amplificación combinados proporcionan comodidad y permiten el ensayo de muestras con volúmenes muy limitados. Usando el formato directo StripAssay, que ensaya veinte y más mutaciones, se puede completar en menos de cinco horas sin equipo costoso. El ADN se aísla de una muestra y se amplifica el gen EGFR (o exones 18-21 o KDR o segmentos del mismo) in vitro (por ejemplo, PCR) y se marca con biotina, preferiblemente en una única reacción de amplificación ("combinada"). Los productos de PCR se hibridan de forma selectiva a sondas oligonucleotídicas (específicas de tipo silvestre y mutante) inmovilizadas en un soporte sólido tal como una tira de ensayo en que las sondas se inmovilizan como líneas o bandas paralelas. Los amplicones biotinilados unidos se detectan usando estreptavidina-fosfatasa alcalina y sustratos de color. Dicho ensayo puede detectar todos o cualquier subconjunto de las mutaciones de la tabla 1. Con respecto a una banda de sonda mutante particular, son posibles uno de tres patrones de señalización: (i) una banda solamente para la sonda de tipo silvestre que indica EGFR normal, (ii) bandas para la sonda tanto de tipo silvestre como mutante que indica genotipo heterocigótico y, (iii) bandas solamente para la sonda mutante que indica genotipo EGFR mutante homocigótico. Por consiguiente, se proporciona adicionalmente un método para detectar mutaciones EGFR de la descripción, que comprende aislar ácido nucleico de una muestra, amplificar el gen EGFR, o fragmento del mismo (por ejemplo, la KDR o exones 18-21 o más pequeño) de modo que el ácido nucleico amplificado comprende un ligando, poner en contacto el gen EGFR amplificado fragmento con una sonda que comprende un compañero de unión detectable al ligando y la sonda es capaz de hibridar específicamente a una mutación EGFR, y después detectar la hibridación de dicha sonda a dicho gen EGFR o fragmento amplificado. En una realización particular, el ligando es biotina y el compañero de unión comprende avidina o estreptavidina. En una realización particular, el compañero de unión es estreptavidina-fosfatasa alcalina que es detectable con sustratos de

color. En una realización particular, las sondas se inmovilizan, por ejemplo, en una tira de ensayo, donde las sondas complementarias a diferentes mutaciones se separan entre sí. Como alternativa, el ácido nucleico amplificado se marca con un radioisótopo en cuyo caso la sonda no tiene que comprender un ligando.

5 Las muestras de tumor también se analizaron para mutaciones en KRAS (mencionado como p21a). Las mutaciones  
particulares detectadas en el exón 1 son: G12C; G12A; G12D; G12R; G12S; G12V; G13C; G13D que se  
correlacionaban con un mal pronóstico a quimioterapia así como quimioterapia con terapia con erlotinib. Por  
consecuente, la descripción proporciona adicionalmente un método para identificar pacientes no sensibles a terapia  
10 de un inhibidor de EGFR tal como erlotinib o erlotinib en combinación con quimioterapia, que comprende determinar  
la presencia o ausencia de una mutación KRAS mediante lo cual la presencia de dicha mutación indica que un  
paciente no responderá a dicha terapia. Como alternativa, se proporciona un método para identificar un tumor en un  
sujeto humano que es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR, que comprende (i) determinar la  
presencia de una proteína o gen KRAS de tipo silvestre en una muestra de dicho tumor, mediante lo cual la  
15 presencia de una proteína o gen KRAS de tipo silvestre indica que el tumor es susceptible a tratamiento con un  
inhibidor de EGFR o (ii) determinar la presencia de una proteína o gen KRAS mutando en una muestra de dicho  
tumor mediante lo cual la ausencia de una proteína o gen KRAS mutado indica que el tumor es susceptible a  
tratamiento con un inhibidor de EGFR. En una realización particular, la mutación es en el exón 1 de K-Ras. En otra  
realización, la mutación K-Ras es al menos una de G12C; G12A; G12D; G12R; G12S; G12V; G13C; G13D. Como  
20 alternativa, los individuos que tienen tumores que albergan K-Ras mutante pueden tratarse con inhibidores de EGFR  
cuando se proporcionan de forma concomitante con un inhibidor de K-Ras. Los métodos para determinar la  
presencia de mutaciones K-Ras son análogos a los usados para identificar mutaciones EGFR descritos en detalle en  
este documento.

De acuerdo con el método de diagnóstico y pronóstico de la presente invención, se detecta una alteración del gen  
25 EGFR de tipo silvestre como se define en las reivindicaciones. Las mutaciones somáticas son aquellas que  
aparecen solamente en ciertos tejidos, por ejemplo, en el tejido tumoral, y no se heredan en la línea germinal. Las  
mutaciones de línea germinal pueden encontrarse en cualquiera de los tejidos corporales. Si solamente un único  
alelo está mutado somáticamente, se indica un estado neoplásico prematuro. Sin embargo, si ambos alelos están  
mutados entonces se indica un estado neoplásico tardío. El hallazgo de mutaciones EGFR, por lo tanto, es un  
30 indicador diagnóstico y pronóstico como se describe en este documento.

Las mutaciones EGFR encontradas en tejidos tumorales pueden provocar actividad de señalización aumentada  
respecto a EGFR de tipo silvestre, que conduce a un estado canceroso. Para detectar la alteración del gen EGFR de  
tipo silvestre, se obtiene una muestra o biopsia del tumor por métodos bien conocidos en la técnica y apropiados  
35 para el tipo particular y localización del tumor. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de lesiones de cáncer  
pulmonar por resección, broncoscopia, aspiración con aguja fina, cepillados bronquiales, o de esputo, fluido pleural o  
sangre. Los medios para enriquecer una preparación tisular para células tumorales son conocidos en la técnica. Por  
ejemplo, el tejido puede aislarse de secciones de parafina o criostato. Las células cancerosas también pueden  
separarse de células normales por citometría de flujo o micro-disección con captura laser. Éstas así como otras  
40 técnicas para separar células tumorales de células normales son bien conocidas en la técnica. Si el tejido tumoral  
está muy contaminado con células normales, la detección de las mutaciones es más difícil.

La detección de mutaciones puntuales puede conseguirse por clonación molecular del alelo (o alelos) de EGFR y  
secuenciación del alelo o alelos usando técnicas bien conocidas en la técnica. Como alternativa, puede usarse  
45 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias génicas directamente desde una preparación  
de ADN genómico del tejido tumoral. La secuencia de ADN de las secuencias amplificadas puede determinarse  
después e identificarse las mutaciones a partir de las mismas. La reacción en cadena de la polimerasa es bien  
conocida en la técnica y se describe en Saiki et al., Science 239:487, 1988; documento U.S. 4.683.203; y documento  
U.S. 4.683.195.

50 Los pares de cebadores específicos que pueden usarse para amplificación por PCR de los exones 18-21 de EGFR  
incluyen:

- 55 <5pEGFR.ex18.out> CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC (SEC ID N.º 39)
- <3pEGFR.ex18.out> GAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC (SEC ID N.º 40)
- <5pEGFR.ex19.out> GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC (SEC ID N.º 41)
- <3pEGFR.ex19.out> CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG (SEC ID N.º 42)
- <5pEGFR.ex20.out> CCATGAGTACGTATTTTGAAACTC (SEC ID N.º 43)
- <3pEGFR.ex20.out> CATATCCCCATGGCAAACCTTGC (SEC ID N.º 44)
- 60 <5pEGFR.ex21.out> CTAACGTTCCGACGCCATAAGTCC (SEC ID N.º 45)
- <3pEGFR.ex21.out> GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG (SEC ID N.º 46)
- <5pEGFR.ex18.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (SEC ID N.º 47)
- <3pEGFR.ex18.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (SEC ID N.º 48)
- <5pEGFR.ex19.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (SEC ID N.º 49)
- 65 <3pEGFR.ex19.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (SEC ID N.º 50)
- <5pEGFR.ex20.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (SEC ID N.º 51)



<3pEGFR.ex20.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCGCAAACCTCTTGCTATCCCAGGAG (SEC ID N.º 52)  
 <5pEGFR.ex21.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAGCCATAAGTCTCGACGTGG (SEC ID N.º 53)  
 <3pEGFR.ex21.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCATCCTCCCCTGCATGTGTTAAAC (SEC ID N.º 54)

5 Los pares de cebadores específicos que pueden usarse para amplificación de PCR del exón 1 de K-Ras incluyen:

<5pKRAS-out> TACTGGTGGAGTATTGATAGTG (SEC ID N.º 55)  
 <3pKRAS-out> CTGTATCAAAGAATGGTCCTG (SEC ID N.º 56)  
 <5pKRA8-in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTTAGTGTATTAACCTTATGTG (SEC ID N.º 57)  
 <3pKRAS-in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCACCTCTATTGTTGGATCATATTTCG (SEC ID N.º 58)

15 La reacción en cadena de la ligasa, que es conocida en la técnica, también puede usarse para amplificar secuencias de EGFR. Véase Wu et al., Genomics, Vol. 4, pág. 560-569 (1989). Además, puede usarse una técnica conocida como PCR específica de alelo. (Véase Ruano y Kidd, Nucleic Acids Research, Vol. 17, pág. 8392, 1989.) De acuerdo con esta técnica, se usan cebadores que hibridan en sus extremos 3' con una mutación EGFR particular. Si la mutación EGFR particular no está presente, no se observa un producto de amplificación. También puede usarse el sistema de mutación refractario a amplificación (ARMS) como se describe en la publicación de solicitud de patente europea n.º 0332435 y en Newton et al., Nucleic Acids Research, Vol. 17, pág. 7, 1989. También pueden detectarse inserciones y deleciones de genes por clonación, secuenciación y amplificación. Además, pueden usarse sondas de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para el gen o genes marcadores adyacentes para valorar la alteración de un alelo o una inserción en un fragmento polimórfico. También puede usarse análisis de polimorfismos conformacionales monocatenarios (SSCP) para detectar variantes de cambios de bases de un alelo. (Orita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 86, pág. 2766-2770, 1989, y Genomics, Vol. 5, pág. 874-879, 1989.) Pueden usarse otras técnicas para detectar inserciones y deleciones que son conocidas en la técnica.

25 La alteración de genes de tipo silvestre también puede detectarse basándose en la alteración de un producto de expresión de tipo silvestre del gen. Dichos productos de expresión incluyen tanto el ARNm de EGFR así como el producto proteico EGFR. Las mutaciones puntuales pueden detectarse amplificando y secuenciando el ARNm o mediante clonación molecular del ADNc preparado a partir del ARNm. La secuencia del ADNc clonado puede determinarse usando técnicas de secuenciación de ADN que son bien conocidas en la técnica. El ADNc también puede secuenciarse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

35 Los desapareamientos, de acuerdo con la presente invención, son dúplex de ácido nucleico hibridados que no son 100 % complementarios. La ausencia de complementariedad total puede deberse a deleciones, inserciones, inversiones, sustituciones o mutaciones con desplazamiento de fase. La detección de desapareamientos puede usarse para detectar mutaciones puntuales en el gen o su producto de ARNm. Aunque estas técnicas son menos sensibles que la secuenciación, son más simples de realizar en una gran cantidad de muestras de tumor. Un ejemplo de una técnica de escisión de desapareamiento es el método de protección de RNasa, que se describe en detalle en Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, pág. 7575, 1985 y Meyers et al., Science, Vol. 230, pág. 1242, 1985. En la práctica de la presente invención, el método implica el uso de una ribosonda marcada que es complementaria a la secuencia codificante del gen EGFR de tipo silvestre humano (o exones 18-21 o KDR del mismo). La ribosonda y cualquier ARNm o ADN aislado del tejido tumoral aparean (hibridan) juntos y posteriormente se digieren con la enzima RNasa A que es capaz de detectar algunos desapareamientos en una estructura de ARN dúplex. Si se detecta un desapareamiento por RNasa A, escinde en el sitio del desapareamiento. Por tanto, cuando se separa la preparación de ARN hibridado en una matriz de gel electroforético, si se ha detectado un desapareamiento y escindido por RNasa A, se observará un producto de ARN que es más pequeño que el ARN dúplex de longitud completa para la ribosonda y el ARNm o ADN. La ribosonda no tiene que ser la longitud completa del ARNm o gen de EGFR pero puede ser los exones 18 a 21 o la KDR de EGFR o segmentos de la misma. Si la ribosonda comprende solamente un segmento del ARNm o gen de EGFR será deseable usar varias de estas sondas para detectar la secuencia completa de ARNm para desapareamientos.

45 De un modo similar, pueden usarse sondas de ADN para detectar desapareamientos, a través de escisión enzimática o química. Véase, por ejemplo, Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 4397, 1988; y Shenk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 72, pág. 989, 1975. Como alternativa, los desapareamientos pueden detectarse por desplazamientos en la movilidad electroforética de dúplex desapareados respecto a dúplex apareados. Véase, por ejemplo, Cariello, Human Genetics, Vol. 42, pág. 726, 1988. Con ribosondas o sondas de ADN, el ARNm o ADN celular que podría contener una mutación puede amplificarse usando PCR antes de la hibridación. También pueden detectarse cambios en el ADN del gen EGFR usando hibridación de Southern, especialmente si los cambios son reordenamientos grandes, tales como deleciones e inserciones.

60 Secuencias de ADN del gen EGFR que se han amplificado mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa también pueden detectarse usando sondas específicas de alelo. Estas sondas son oligómeros de ácido nucleico, cada uno de los cuales contiene una región de la secuencia génica de EGFR que alberga una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede ser de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, correspondiente a una parte de la secuencia génica de EGFR. Mediante el uso de una batería de dichas sondas específicas de alelo, pueden detectarse productos de amplificación de PCR para identificar la presencia de una mutación previamente identificada

en el gen EGFR. La hibridación de sondas específicas de alelo con secuencias amplificadas de EGFR puede realizarse, por ejemplo, en un filtro de nylon. La hibridación a una sonda particular en condiciones rigurosas de hibridación indica la presencia de la misma mutación en el tejido tumoral que en la sonda específica de alelo.

5 También puede detectarse alteración de genes EGFR de tipo silvestre detectando alteración de la proteína EGFR de tipo silvestre. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales inmunorreactivos con EGFR para explorar un tejido. La ausencia de antígeno afín indicaría una mutación EGFR. También podrían usarse anticuerpos específicos para productos de alelos mutantes para detectar producto génico de EGFR mutante. Los anticuerpos pueden identificarse a partir de bibliotecas de presentación en fago. Dichos ensayos inmunológicos pueden hacerse en cualquier formato conveniente conocido en la técnica. Estos incluyen transferencias de Western, ensayos inmunohistoquímicos y ensayos ELISA. Puede usarse cualquier medio para detectar una proteína EGFR alterada para detectar alteración de genes EGFR de tipo silvestre.

15 Los genes o productos génicos de EGFR mutantes pueden detectarse a partir de tumor o a partir de otras muestras corporales tales como orina, esputo o suero. Pueden aplicarse las mismas técnicas analizadas anteriormente para la detección de genes o productos génicos de EGFR mutante en muestras de tumor a otras muestras corporales. Las células cancerosas se desprenden de tumores y aparecen en dichas muestras corporales. Explorando dichas muestras corporales, puede conseguirse un diagnóstico prematuro simple para muchos tipos de cánceres. Además, el progreso de quimioterapia o radioterapia puede controlarse más fácilmente ensayando dichas muestras corporales para genes o productos génicos de EGFR mutante.

El método de diagnóstico de la presente invención es útil para los médicos de modo que puedan decidir sobre un curso apropiado de tratamiento. Por ejemplo, un tumor que presenta alteración de ambos alelos EGFR puede sugerir un régimen terapéutico más agresivo que un tumor que presenta alteración de solamente un alelo EGFR.

25 Los pares de cebadores de la presente descripción son útiles para la determinación de la secuencia de nucleótidos de un alelo EGFR particular usando la reacción en cadena de la polimerasa. Los pares de cebadores de ADN monocatenario pueden hibridarse a secuencias dentro de o que rodean el gen EGFR para cebar la síntesis de ADN de amplificación del propio gen EGFR. Un conjunto de estos cebadores permite la síntesis de todos los nucleótidos de los exones 18-21 de EGFR. Pueden también usarse cebadores específicos de alelo. Dichos cebadores hibridan solamente con alelos mutantes EGFR particulares, y por tanto solamente amplificarán un producto en presencia del alelo mutante como molde. Para facilitar la posterior clonación de secuencias amplificadas, los cebadores pueden tener secuencias de sitio de enzima de restricción adjuntas a sus extremos. Por tanto, todos los nucleótidos de los cebadores se obtienen de los exones 18-21 de EGFR o secuencias adyacentes a los mismos excepto los pocos nucleótidos necesarios para formar un sitio de enzima de restricción. Dichas enzimas y sitio son bien conocidos en la técnica. Los cebadores en sí mismos pueden sintetizarse usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Generalmente, los cebadores pueden prepararse usando máquinas de síntesis de oligonucleótidos que están disponibles en el comercio. El diseño de cebadores particulares pertenece a las habilidades de la técnica.

40 Las sondas de ácido nucleico proporcionadas por la presente descripción son útiles para varios propósitos. Pueden usarse en hibridación de Southern a ADN genómico y en el método de protección de RNasa para detectar mutaciones puntuales ya analizadas anteriormente. Las sondas pueden usarse para detectar productos de amplificación por PCR. También pueden usarse para detectar desapareamientos con el gen o ARNm de EGFR usando otras técnicas. Los desapareamientos pueden detectarse usando enzimas (por ejemplo, nucleasa S1), agentes químicos (por ejemplo, hidroxilamina o tetróxido de osmio y piperidina), o cambios en la movilidad electroforética de híbridos desapareados en comparación con híbridos totalmente apareados. Estas técnicas son conocidas en la técnica. Véase Novack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, pág. 586, 1986. Generalmente, las sondas son complementarias a secuencias del exón 18-21 de EGFR, aunque también se contemplan generalmente sondas para el dominio quinasa y segmentos del mismo. Puede usarse una batería completa de sondas de ácido nucleico para componer un kit para detectar alteraciones de genes EGFR de tipo silvestre. El kit permite la hibridación a la secuencia del exón 18-21 completo del gen EGFR. Las sondas pueden solapar entre sí o ser contiguas.

55 Si se usa una ribosonda para detectar desapareamientos con ARNm, es complementaria al ARNm del gen EGFR. La ribosonda por tanto es una sonda antisentido porque no codifica la proteína EGFR porque es complementaria a la hebra con sentido. La ribosonda generalmente se marcará con un material radiactivo, colorimétrico, o fluorométrico, que puede conseguirse por cualquier medio conocido en la técnica. Si la ribosonda se usa para detectar desapareamientos con ADN, puede ser de cualquier polaridad, con sentido o antisentido. Asimismo, también pueden usarse sonda de ADN para detectar desapareamientos.

60 La predisposición a cánceres puede averiguarse ensayando cualquier tejido de un ser humano para mutaciones del gen EGFR. Por ejemplo, una persona que ha heredado una mutación EGFR de línea germinal sería propensa a desarrollar cánceres. Esto puede determinarse ensayando ADN de cualquier tejido del cuerpo. Por ejemplo, puede extraerse sangre y extraerse el ADN de las células de la sangre. Además, puede conseguirse un diagnóstico prenatal ensayando células fetales, células placentarias, o fluido amniótico para mutaciones del gen EGFR. Una alteración de un alelo EGFR de tipo silvestre, sea, por ejemplo, por mutación puntual o por delección, puede

detectarse por cualquiera de los medios analizados anteriormente.

### Ejemplos

#### 5 Ejemplo 1 Preparación de portaobjetos - desparafinización y tinción

Se sumergieron secciones en las siguientes soluciones:

1. Xilenos frescos (para desparafinizar las secciones) - 5 min
- 10 2. Xilenos frescos - 5 min
3. Etanol al 100 % - 15 s
4. Etanol al 95 % - 15 s
5. Etanol al 70 % - 15 s
- 15 6. Agua desionizada - 15 s
7. Hematoxilina de Mayer - 30 s
8. Agua desionizada - aclarar (x 2) - 15 s
9. Etanol al 70 % - 15 s
10. Eosina Y - 5 s
- 20 11. Etanol al 95 % - 15 s
12. Etanol al 95 % - 15 s
13. Etanol al 100 % - 15 s
14. Etanol al 100 % - 15 s
15. Xilenos (para asegurar la deshidratación de la sección) - 60 s
- 25 16. Secado al aire durante aproximadamente 2 minutos o pistola de aire usada suavemente para retirar completamente los xilenos.
17. El tejido entonces estaba listo para LCM.

#### Ejemplo 2 Micro-disección de captura láser y extracción de ADN

##### 30 Materiales:

- Sistema PixCell II LCM
- Cubiertas CapSure HS o CapSure Macro LCM
- Dispositivo ExtractSure (HS solamente)
- 35 Cuchillas de afeitar (estériles de fábrica)
- Tubos de 0,5 ml
- Tubos de 0,2 ml
- Kit de extracción de ADN PicoPure
- Incubadora a 65 °C

40

##### Procedimientos:

1. Se colocó cubierta CapSure sobre el área de tejido a recoger
2. Se aplicó láser sobre el área deseada
- 45 3. Se levantó la cubierta del tejido.
4. Se distribuyeron 20 ul de tampón de digestión PicoPure con Proteinasa K en tubo de 0,5 ml.
5. Se colocó la cubierta con material diseccionado en el tubo para formar un sello hermético.
6. Se invirtió el tubo de modo que se dirigiera la cubierta cubierto con tampón.
7. Se incubó a 65 °C durante 24 horas.
- 50 8. Se agitó el tubo con la cubierta para recoger el material digerido en el fondo del tubo.
9. Se transfirió la digestión a un tubo de separación de 0,2 ml.
10. Se inactivó Proteinasa K a 95 °C durante 10 minutos en un termociclador con una tapa calentada.
11. Se usaron 1-2 ul de muestra en una reacción de PCR de 50 ul. No fue necesaria limpieza.

#### 55 Ejemplo 3 Amplificación por PCR

##### Cebadores de PCR:

60 Se diseñaron cebadores de PCR para cada exón a secuenciar (exones 18, 19, 20 y 21 de *EGFR*). Las secuencias cebadoras usadas fueron las siguientes:

- <5pEGFR.ex18.out> CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC (SEC ID N.º 39)
- <3pEGFR.ex18.out> GAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC (SEC ID N.º 40)
- <5pEGFR.ex19.out> GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC (SEC ID N.º 41)
- 65 <3pEGFR.ex19.out> CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG (SEC ID N.º 42)
- <5pEGFR.ex20.out> CCATGAGTACGTATTTTGAAGCTC (SEC ID N.º 43)

## ES 2 564 127 T3

<3pEGFR.ex20.out> CATATCCCCATGGCAAACCTCTTGC (SEC ID N.º 44)  
<5pEGFR.ex21.out> CTAACGTTCCGCCAGCCATAAGTCC (SEC ID N.º 45)  
<3pEGFR.ex21.out> GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG (SEC ID N.º 46)  
5 <5pEGFR.ex18.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAGTGCCGTGTCTGGCACCCAAGC (SEC ID N.º 47)  
<3pEGFR.ex18.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (SEC ID N.º 48)  
<5pEGFR.ex19.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCCCTTAGGTGCGGCTCCACAGC (SEC ID N.º 49)  
<3pEGFR.ex19.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCATTTAGGATGTGGAGATGAGC (SEC ID N.º 50)  
<5pEGFR.ex20.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAACACTCAAGATCGCATTTCATGC (SEC ID N.º 51)  
<3pEGFR.ex20.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCCAAACCTCTTGCTATCCAGGAG (SEC ID N.º 52)  
10 <5pEGFR.ex21.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAGTCCCTCGACGTGG (SEC ID N.º 53)  
<3pEGFR.ex21.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCATCTCCCTGCATGTGTTAAAC (SEC ID N.º 54)

### Oligos K-Ras para PCR

15 <5pKRAS-out> TACTGGTGGAGTATTTGATAGTG (SEC ID N.º 55)  
<3pKRAS-out> CTGTATCAAAGAATGGTCCTG (SEC ID N.º 56)  
<5pKRA8-in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTTAGTGTATTAACCTTATGTG (SEC ID N.º 57)  
<3pKRAS-in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCACCTCTATTGTTGGATCATATTCCG (SEC ID N.º 58)

20 Se realizó amplificación anidada del producto de PCR principal usando pares de cebadores específicos de intrón localizados dentro del producto de PCR principal. Estos pares de cebadores anidados se marcaron con secuencias M13f y M13rev.

### Primera ronda de PCR:

25

#### Reacción de PCR:

|                   |   |
|-------------------|---|
| ADN               | 0,5 a 30 ng   |
| Cebadores         | 250 nM/cada cebador externo   |
| dNTP              | 0,2 mM cada uno (Roche n.º cat. 1581295)  |
| MgCl <sub>2</sub> | 1,5 mM (tampón 10 X 15 mM)  |
| Enzima            | <u>1,5 U/RX Expand High fidelity Taq (Roche n.º cat. 1759078)</u><br>50 ul de volumen de reacción |

### Condiciones del termociclador:

30 95 °C - 3 minutos  
94 °C - 30 segundos repetir 35 veces  
58 °C - 30 segundos  
72 °C - 1 minuto  
72 °C - 8 minutos  
35 4 °C - constantemente

### Segunda ronda de PCR:

#### Reacción de PCR:

|                   |   |
|-------------------|---|
| ADN               | 1 ul de primera ronda de reacción de PCR  |
| Cebadores         | 250 nM/cada cebador interno   |
| dNTP              | 0,2 mM cada uno (Roche n.º cat. 1581295)  |
| MgCl <sub>2</sub> | 1,5 mM (tampón 10 X 15 mM)  |
| Enzima            | <u>1,5 U/RX Expand High fidelity Taq (Roche n.º cat. 1759078)</u><br>50 ul de volumen de reacción |

### Condiciones del termociclador:

40 95 °C - 3 minutos  
94 °C - 30 segundos repetir 30 veces  
58 °C - 30 segundos  
72 °C - 1 minuto  
72 °C - 8 minutos  
45 4 °C - constantemente

### Aislamiento de productos de PCR:

50 Los productos de reacción de PCR se ejecutaron en geles de agarosa al 2 % E-Gel (Invitrogen, n.º cat. G6018-02) para control de calidad. Los productos de PCR se purificaron directamente usando el kit de purificación de PCR Qiaquick 96 (Qiagen, n.º cat. 28181) o se purificaron en gel según fue necesario. Para la purificación en gel, el producto de PCR se escindió del E-gel y se purificó el ADN usando el kit de purificación de PCR Qiaquick 96 con un

protocolo de extracción de gel. (Qiagen, n.º cat. 28181).

Ejemplo 4 Secuenciación

5 Se usaron cebadores de secuenciación anidados o cebadores de secuenciación convencionales M13f y M13rev para productos de PCR marcados para secuenciar los productos de PCR purificados. Las secuencias fueron las siguientes:

10 <m13f> TGTA AACGACGGCCAGT (SEC ID N.º 59)  
<m13r> CAGGAAACAGCTATGACC (SEC ID N.º 60)

Se diluyeron los productos de PCR purificados y se secuenciaron de forma cíclica usando el kit BigDye Terminator (ABI, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Mezcla de reacción:

5 ul de ADN (25-100 ng de producto de PCR)  
6 ul de agua  
1 ul de cebador diluido a 0,25 DO/100 ul con agua (m13f o m13r o cebador específico de secuencia)  
20 2 ul de BigDye v3.1  
6 ul de tampón de dilución (equivalente a tampón de dilución ABI 5x)

Secuenciación cíclica:

25 Condiciones:

96 °C - 2,5 minutos - desnaturalización inicial  
96 °C - 10 segundos  
30 50 °C - 5 segundos  
30 °C - 4 minutos

35 Repetido durante un total de 25 a 50 ciclos

Limpieza de reacción:

Se retiraron los nucleótidos no incorporados usando:  
40 sephadex al 8 %  
500 ul en bloque de 96 pocillos Edge BioSystem  
centrifugado a 750 g durante dos minutos

45 Análisis:

Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en instrumentos de secuenciación ABI3700 o ABI3730. Los electroferogramas se analizaron para detectar mutaciones usando programas de análisis disponibles en el comercio tales como Sequencher (Gene Codes, Corp), y con herramientas personalizadas.

50 Ejemplo 5 Respuesta a dosis

Se marcaron con epítipo construcciones de tipo silvestre y mutantes de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano usadas en este estudio en el extremo N-terminal con la secuencia señal del virus del herpes simple de gD, reemplazando la secuencia señal de EGFR endógeno (Schaefer et al. 1999 J. Biol. Chem. 274, 859-866). Se sembraron células Cos7 en placas de 12 pocillos en medio de cultivo normal 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con 0,25 ug por pocillo con ADN plasmídicos de expresión (pRK5.gD.EGFR tipo silvestre, pRK5.gD.EGFR. L858R, o pRK5.gD.EGFR.del(E746-S752)) usando LipofectAMINE 2000 siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Invitrogen). Veinticuatro horas post-transfección, las células se privaron de suero durante seis horas en DMEM sin suero. Una hora antes de la estimulación, las células transfectadas se pre-incubaron con las concentraciones indicadas de erlotinib. Las células transfectadas se estimularon con TGF  $\alpha$  1 nM durante 10 minutos. Las células se lisaron directamente en los pocillos usando tampón de Laemmli reductor. Se detectó autofosforilación del receptor, un índice de activación del receptor EGFR por estimulación del factor de crecimiento, por transferencia de Western usando un anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado a HRP (Oncogene Sciences, AB-4). Se evaluó la eficacia de transfección usando un anticuerpo específico para la marca epitépica gD (5B6). Se evaluó el nivel de activación del receptor a partir de los

autorradiogramas usando el software NIH Image. Estos datos después se usaron para general un gráfico a partir del cual se calculó la CI50 usando una función de ajuste de 4 parámetros. Como se ilustra por los resultados a continuación, erlotinib tiene una afinidad mayor por EGFR que contiene mutaciones en comparación con EGFR de tipo silvestre.

5

| construcción de EGFR | inhibición (CI50) |
|----------------------|-------------------|
| EGFR-gD TS           | 50 nM             |
| L858R EGFR-gD        | 20 nM             |
| del(746-752) EGFR-gD | 5 nM              |

Se describen los siguientes párrafos numerados (párr.)

10

1. Un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible a tratamiento, que comprende determinar la presencia de un gen EGFR mutado o proteína EGFR mutada en una muestra de dicho tumor donde dicha mutación está localizada en los exones 18-21 de EGFR, mediante lo cual la presencia de un gen EGFR mutado o proteína EGFR mutada diferente a T790M indica que el tumor es susceptible a tratamiento.

15

2. El método del párr. 1 donde dicho tratamiento es un agente quimioterapéutico.

20

3. El método del párr. 2 donde dicho agente quimioterapéutico es uno o más de citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'- desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiaurea, metotrexato; bleomicina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, mitoxantrona; camptotecina, topotecán; tenipósido; colcemid, colchicina, paclitaxel, vinblastina vincristina o tamoxifeno.

25

4. El método del párr. 2 donde dicho agente quimioterapéutico es carboplatino y/o paclitaxel.

5. El método del párr. 1 donde dicho tratamiento es un inhibidor de EGFR.

30

6. El método del párr. 5 donde dicho inhibidor de EGFR es uno o más de cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.

7. El método del párr. 5 donde dicho inhibidor de EGFR es erlotinib.

35

8. El método del párr. 1 donde dicha mutación está localizada en el dominio quinasa de EGFR.

9. El método del párr. 8 donde dicha mutación es al menos una de G719A, G719C, G719S, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, H773Y, S768I, S784F, L858R, L858P, L861Q, E746-A748 del, E746-A750 del, E746-R748 del, L747-E749 del, R748-P753 del, L747-S752 del, E746V, L747-T751 del, L747-P753 del, S752-I759 del, M766-A767 AI ins, S768-V769 SVA ins, P772-H773 NS ins y P772-H773 V ins.

40

10. El método del párr. 8 donde dicha mutación es al menos una de G719A, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, S768I, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 AI ins, S768-V769 SVA ins y P772-H773 NS ins.

45

11. El método del párr. 8 donde dicha mutación es al menos una de 2402G>C; 2401G>T; 2401G>A; 2482G>A; 2486T>C; 2491G>C; 2494G>C; 2510C>T; 2539G>A; 2556C>T; 2563C>T; 2576T>A; 2819T>G; 2819T>C; 2482-2490 del; 2481-2495 del; 2482-2490 del; 2485-2493 del; 2494G>C; 2486-2503 del; 2485-2502 del; 2483A>T; 2486-2494del; 2499-2522 del; 2544-2545 ins GCCATA; 2554-2555 ins CCAGCGTGG; 2561-2562 ins GGT; y 2562-2563 ins AACTCC.

50

12. El método del párr. 8 donde dicha mutación es al menos una de 2402G>C; 2482G>A; 2486T>C; 2491G>C; 2494G>C; 2510C>T; 2539G>A; 2549G>T; 2563C>T; 2819T>C; 2482-2490 del; 2486-2503 del; 2544-2545 ins GCCATA; 2554-2555 ins CCAGCGTGG; y 2562-2563 ins AACTCC.

55

13. Un método para identificar una mutación EGFR en una muestra, que comprende poner en contacto el ácido nucleico de dicha muestra con una sonda de ácido nucleico que es capaz de hibridar específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada, o fragmento de la misma que incorpora una mutación y detectar dicha hibridación.

60

14. El método del párr. 13 donde dicha mutación está en el dominio quinasa de EGFR.

15. El método del párr. 13 donde dicha mutación EGFR es al menos una de 2402G>C; 2401G>T; 2401G>A; 2482G>A; 2486T>C; 2491G>C; 2494G>C; 2510C>T; 2539G>A; 2556C>T; 2563C>T; 2576T>A; 2615C>T; 2819T>G; 2819T>C; 2482-2490 del ; 2481-2495 del; 2482-2490 del; 2485-2493 del; 2494G>C; 2486-2503 del; 2485-2502 del; 2483A>T; 2486-2494 del; 2499-2522 del; 2544-2545 ins GCCATA; 2554-2555 ins CCAGCGTGG; 2561-2562 ins GGT; y 2562-2563 ins AACTCC.

16. El método del párr. 13 donde dicha mutación EGFR es al menos una de 2402G>C; 2482G>A; 2486T>C; 2491G>C; 2494G>C; 2510C>T; 2539G>A; 2549G>T; 2563C>T; 2615C>T 2819T>C; 2482-2490 del; 2486-2503 del; 2544-2545 ins GCCATA; 2554-2555 ins CCAGCGTGG; y 2562-2563 ins AACTCC.
- 5 17. El método del párr. 13 donde dicha sonda está marcada de forma detectable.
18. El método del párr. 13 donde dicha sonda es un oligómero antisentido.
19. El método del párr. 13 donde el gen EGFR o fragmento del mismo en dicha muestra de ácido nucleico se amplifica y pone en contacto con dicha sonda.
- 10
20. El uso de agente antineoplásico en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor que tiene una mutación EGFR, donde dicha mutación EGFR en dicho tumor es al menos una de G719A, G719C, G719S, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, H773Y, S768I, S784F, L858R, L858P, L861Q, E746-A748 del, E746-A750 del, E746-R748 del, L747-E749 del, R748-P753 del, L747-S752 del, E746V, L747-T751 del, L747-P753 del, S752- I759 del, M766-A767 AI ins, S768-V769 SVA ins, P772-H773 NS ins y P772-H773 V ins.
- 15
21. El uso del párr. 20 donde dicho agente antineoplásico es un agente quimioterapéutico.
- 20
22. El uso del párr. 20 donde dicho agente antineoplásico e un inhibidor de EGFR.
23. El uso del párr. 21 donde dicho agente quimioterapéutico es uno o más de citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, bleomicina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, mitoxantrona, camptotecina, topotecán; tenipósido; colcemid, colchicina, paclitaxel, vinblastina, vincristina, o tamoxifeno.
- 25
24. El uso del párr. 21 donde dicho agente quimioterapéutico es uno o más de metotrexato; bleomicina, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, mitoxantrona, paclitaxel, vinblastina, vincristina o tamoxifeno.
- 30
25. El uso del párr. 22 donde dicho agente quimioterapéutico es uno o más de cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
- 35
26. El uso del párr. 20 donde dicha mutación EGFR es al menos una de G719A, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, S768I, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 AI ins, S768-V769 SVA ins y P772-H773 NS ins.
- 40
27. Una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada o fragmento de la misma que incorpora una mutación.
- 45
28. La sonda del párr. 27 donde dicha sonda es complementaria a dicho ácido nucleico que codifica la EGFR mutada o dicho fragmento de la misma.
29. La sonda del párr. 27 que tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos.
30. La sonda del párr. 27 que comprende adicionalmente un marcador detectable.
31. La sonda del párr. 27 donde dicha mutación es al menos una de G719A, G719C, G719S, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858R, L858P, L861Q, E746-A748 del, E746-A750 del, E746-R748 del, L747-E749 del, R748-P753 del, L747-S752 del, E746V, L747-T751 del, L747-P753 del, S752-I759 del, M766-A767 AI ins, S768- V769 SVA ins, y P772-H773 V ins.
- 50
32. La sonda del párr. 27 donde dicha mutación es al menos una de G719A, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, S768I, H773Y, S784F, T790M, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 AI ins, P772-H773 NS ins y S768-V769 SVA ins.
- 55
33. Un método para detectar un gen EGFR mutado en una muestra, que comprende amplificar dicho ácido nucleico de la muestra correspondiente al dominio quinasa de dicho gen EGFR, o un fragmento del mismo sospechoso de contener una mutación, y comparar la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del correspondiente gen EGFR de tipo silvestre o fragmento del mismo.
- 60
34. El método del párr. 33 donde la movilidad electroforética se determina en gel de poliacrilamida.
35. Un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR, que comprende (i) determinar la presencia de una proteína o gen RAS de tipo silvestre en una muestra de dicho tumor mediante lo cual la presencia de una proteína o gen RAS de tipo silvestre indica que el
- 65

tumor es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR o (ii) determinar la presencia de una proteína o gen RAS mutado en una muestra de dicho tumor mediante lo cual la ausencia de una proteína o gen RAS mutado indica que el tumores susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR.

5 36. El método del párr. 36 donde dicha mutación RAS es al menos una de G12C; G12A; G12D; G12R; G12S; G12V; G13C; G13D.

10 37. Un método para determinar el pronóstico de un paciente que tiene un tumor, que comprende determinar en una muestra de dicho tumor la presencia o ausencia de la mutación EGFR T790M mediante lo cual la presencia de dicha mutación EGFR T790M indica peor pronóstico en comparación con la ausencia de dicha mutación EGFR T790M.

15 38. Un método para identificar un tumor que es resistente a tratamiento con un inhibidor de EGFR, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación EGFR T790M en una muestra del tumor mediante lo cual la presencia de dicha mutación indica que el tumor es resistente a tratamiento con un inhibidor de EGFR.

20 39. Un método para detectar compuestos que inhiben la señalización de una proteína EGFR mutante que incorpora una mutación T790M, que comprende poner en contacto dicho EGFR mutante en un compuesto de ensayo en presencia de un sustrato de fosforilación y ATP, y detectar un cambio en la cantidad de fosforilación de dicho sustrato mediante lo cual una reducción de la fosforilación de dicho sustrato en comparación con un control o en comparación con la fosforilación del sustrato en ausencia del compuesto de ensayo, indica que dicho compuesto de ensayo es un inhibidor de la señalización de EGFR mutante.

25 Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC.

30 <120> Mutaciones EGFR

<130> CMD/FP6747802

<140> Solicitud divisional EP basada en la EP 05757355.2

35 <141> 02-06-2005

<150> EP 05757355.2

<151> 02-06-2005

40 <150> PCT/US2005/019653

<151> 02-06-2005

<150> US 60/577.425

<151> 04-06-2004

45 <150> US 60/635.344

<151> 10-12-2004

<150> US 60/666.068

50 <151> 28-03-2005

<160> 60

<210> 1

<211> 1210

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1



ES 2 564 127 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Pro | Ser | Gly | Thr | Ala | Gly | Ala | Ala | Leu | Leu | Ala | Leu | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Ala | Ala | Leu | Cys | Pro | Ala | Ser | Arg | Ala | Leu | Glu | Glu | Lys | Lys | Val |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Cys | Gln | Gly | Thr | Ser | Asn | Lys | Leu | Thr | Gln | Leu | Gly | Thr | Phe | Glu |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |
| Asp | His | Phe | Leu | Ser | Leu | Gln | Arg | Met | Phe | Asn | Asn | Cys | Glu | Val |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |
| Val | Leu | Gly | Asn | Leu | Glu | Ile | Thr | Tyr | Val | Gln | Arg | Asn | Tyr | Asp |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |
| Leu | Ser | Phe | Leu | Lys | Thr | Ile | Gln | Glu | Val | Ala | Gly | Tyr | Val | Leu |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |
| Ile | Ala | Leu | Asn | Thr | Val | Glu | Arg | Ile | Pro | Leu | Glu | Asn | Leu | Gln |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |
| Ile | Ile | Arg | Gly | Asn | Met | Tyr | Tyr | Glu | Asn | Ser | Tyr | Ala | Leu | Ala |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |
| Val | Leu | Ser | Asn | Tyr | Asp | Ala | Asn | Lys | Thr | Gly | Leu | Lys | Glu | Leu |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |
| Pro | Met | Arg | Asn | Leu | Gln | Glu | Ile | Leu | His | Gly | Ala | Val | Arg | Phe |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |
| Ser | Asn | Asn | Pro | Ala | Leu | Cys | Asn | Val | Glu | Ser | Ile | Gln | Trp | Arg |

ES 2 564 127 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |
| Asp | Ile | Val | Ser | Ser | Asp | Phe | Leu | Ser | Asn | Met | Ser | Met | Asp | Phe |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |
| Gln | Asn | His | Leu | Gly | Ser | Cys | Gln | Lys | Cys | Asp | Pro | Ser | Cys | Pro |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |
| Asn | Gly | Ser | Cys | Trp | Gly | Ala | Gly | Glu | Glu | Asn | Cys | Gln | Lys | Leu |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 210 |
| Thr | Lys | Ile | Ile | Cys | Ala | Gln | Gln | Cys | Ser | Gly | Arg | Cys | Arg | Gly |
|     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |
| Lys | Ser | Pro | Ser | Asp | Cys | Cys | His | Asn | Gln | Cys | Ala | Ala | Gly | Cys |
|     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Thr | Gly | Pro | Arg | Glu | Ser | Asp | Cys | Leu | Val | Cys | Arg | Lys | Phe | Arg |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |
| Asp | Glu | Ala | Thr | Cys | Lys | Asp | Thr | Cys | Pro | Pro | Leu | Met | Leu | Tyr |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |
| Asn | Pro | Thr | Thr | Tyr | Gln | Met | Asp | Val | Asn | Pro | Glu | Gly | Lys | Tyr |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |
| Ser | Phe | Gly | Ala | Thr | Cys | Val | Lys | Lys | Cys | Pro | Arg | Asn | Tyr | Val |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |
| Val | Thr | Asp | His | Gly | Ser | Cys | Val | Arg | Ala | Cys | Gly | Ala | Asp | Ser |
|     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |
| Tyr | Glu | Met | Glu | Glu | Asp | Gly | Val | Arg | Lys | Cys | Lys | Lys | Cys | Glu |
|     |     |     |     | 320 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |
| Gly | Pro | Cys | Arg | Lys | Val | Cys | Asn | Gly | Ile | Gly | Ile | Gly | Glu | Phe |
|     |     |     |     | 335 |     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |
| Lys | Asp | Ser | Leu | Ser | Ile | Asn | Ala | Thr | Asn | Ile | Lys | His | Phe | Lys |
|     |     |     |     | 350 |     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |
| Asn | Cys | Thr | Ser | Ile | Ser | Gly | Asp | Leu | His | Ile | Leu | Pro | Val | Ala |
|     |     |     |     | 365 |     |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |
| Phe | Arg | Gly | Asp | Ser | Phe | Thr | His | Thr | Pro | Pro | Leu | Asp | Pro | Gln |
|     |     |     |     | 380 |     |     |     |     | 385 |     |     |     |     | 390 |
| Glu | Leu | Asp | Ile | Leu | Lys | Thr | Val | Lys | Glu | Ile | Thr | Gly | Phe | Leu |
|     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |     |     |     | 405 |
| Leu | Ile | Gln | Ala | Trp | Pro | Glu | Asn | Arg | Thr | Asp | Leu | His | Ala | Phe |
|     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |     |     | 420 |
| Glu | Asn | Leu | Glu | Ile | Ile | Arg | Gly | Arg | Thr | Lys | Gln | His | Gly | Gln |
|     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |     |     | 435 |
| Phe | Ser | Leu | Ala | Val | Val | Ser | Leu | Asn | Ile | Thr | Ser | Leu | Gly | Leu |
|     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |     | 450 |
| Arg | Ser | Leu | Lys | Glu | Ile | Ser | Asp | Gly | Asp | Val | Ile | Ile | Ser | Gly |
|     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     | 465 |
| Asn | Lys | Asn | Leu | Cys | Tyr | Ala | Asn | Thr | Ile | Asn | Trp | Lys | Lys | Leu |
|     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |

ES 2 564 127 T3

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly  
 485 490 495  
 Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys  
 500 505 510  
 Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser  
 515 520 525  
 Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn  
 530 535 540  
 Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys  
 545 550 555  
 Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr  
 560 565 570  
 Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr  
 575 580 585  
 Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met  
 590 595 600  
 Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His  
 605 610 615  
 Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly  
 620 625 630  
 Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser  
 635 640 645  
 Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val  
 650 655 660  
 Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg  
 665 670 675  
 Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu  
 680 685 690  
 Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg  
 695 700 705  
 Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser  
 710 715 720  
 Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly  
 725 730 735  
 Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala  
 740 745 750  
 Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val  
 755 760 765  
 Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile  
 770 775 780  
 Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe  
 785 790 795  
 Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly  
 800 805 810

ES 2 564 127 T3

Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met  
815 820 825

Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala  
830 835 840

Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp  
845 850 855

Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His  
860 865 870

Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser  
875 880 885

Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr  
890 895 900

Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr  
905 910 915

Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly  
920 925 930

Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met  
935 940 945

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

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

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

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

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

Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu  
1025 1030 1035

Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile  
1040 1045 1050

Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe  
1055 1060 1065

Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp  
1070 1075 1080

Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln  
1085 1090 1095

Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr  
1100 1105 1110

His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr  
1115 1120 1125

Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn

ES 2 564 127 T3

|     |      |     |      |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |      |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|
|     | 1130 |     | 1135 |     | 1140 |     |     |     |      |     |     |     |     |      |
| Thr | Val  | Gln | Pro  | Thr | Cys  | Val | Asn | Ser | Thr  | Phe | Asp | Ser | Pro | Ala  |
|     |      |     | 1145 |     |      |     |     |     | 1150 |     |     |     |     | 1155 |
| His | Trp  | Ala | Gln  | Lys | Gly  | Ser | His | Gln | Ile  | Ser | Leu | Asp | Asn | Pro  |
|     |      |     | 1160 |     |      |     |     |     | 1165 |     |     |     |     | 1170 |
| Asp | Tyr  | Gln | Gln  | Asp | Phe  | Phe | Pro | Lys | Glu  | Ala | Lys | Pro | Asn | Gly  |
|     |      |     | 1175 |     |      |     |     |     | 1180 |     |     |     |     | 1185 |
| Ile | Phe  | Lys | Gly  | Ser | Thr  | Ala | Glu | Asn | Ala  | Glu | Tyr | Leu | Arg | Val  |
|     |      |     | 1190 |     |      |     |     |     | 1195 |     |     |     |     | 1200 |
| Ala | Pro  | Gln | Ser  | Ser | Glu  | Phe | Ile | Gly | Ala  |     |     |     |     |      |
|     |      |     | 1205 |     |      |     |     |     | 1210 |     |     |     |     |      |

5 <210> 2  
 <211> 5616  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

ES 2 564 127 T3

ccccggcgca ggcgggccc agcagcctcc gccccccgca cgggtgtgagc 50  
gccccgacgcg gccgaggcgg ccggagctccc gagctagccc cggcgggccc 100  
cgccgcccag accggacgac aggccaacctc gtcggcgtcc gcccgagtcc 150  
ccgcctcgcc gccaacgcca caaccaccgc gcacggcccc ctgactccgt 200  
ccagtattga tcgggagagc cggagcggagc tcttcgggga gcagcgatgc 250  
gaccctccgg gacggccggg gcagcgtcc tggcgtgct ggctgcgctc 300  
tgcccggcga gtcgggctct ggaggaaaag aaagtttgcc aaggcacgag 350  
taacaagctc acgcagttgg gcacttttga agatcatttt ctcagcctcc 400  
agaggatggt caataactgt gaggtggtcc ttgggaattt ggaaattacc 450  
tatgtgcaga ggaattatga tctttccttc ttaaagacca tccaggaggt 500  
ggctggttat gtcctcattg ccctcaacac agtggagcga attcctttgg 550  
aaaacctgca gatcatcaga ggaaatatgt actacgaaa ttcctatgcc 600  
ttagcagtct tatctaacta tgatgcaaat aaaaccggac tgaaggagct 650  
gcccattgaga aatttacagg aaatcctgca tggcgccgtg cggttcagca 700  
acaaccctgc cctgtgcaac gtggagagca tccagtggcg ggacatagtc 750  
agcagtgact ttctcagcaa catgtcgatg gacttocaga accaactggg 800  
cagctgcaa aagtgtgatc caagctgtcc caatgggagc tgctggggtg 850  
caggagagga gaactgccag aaactgacca aaatcatctg tgcccagcag 900  
tgctccgggc gctgccgtgg caagtcccc agtgactgct gccacaacca 950  
gtgtgctgca ggctgcacag gccccggga gagcgactgc ctggtctgcc 1000  
gcaaattccg agaogaagcc acgtgcaagg acaactgccc ccaactcatg 1050

ES 2 564 127 T3

ctctacaacc ccaccacgta ccagatggat gtgaaccccc agggcaaata 1100  
 cagctttggt gccacctgcg tgaagaagtg tccccgtaat tatgtggtga 1150  
 cagatcacgg ctctgtcgcg cgagcctgtg gggccgacag ctatgagatg 1200  
 gaggaagacg gcgtccgcaa gtgtaagaag tgccaagggc cttgccgcaa 1250  
 agtgtgtaac ggaataggta ttggtgaatt taaagactca ctctccataa 1300  
 atgctacgaa tattaaacac ttcaaaaact gcacctccat cagtggcgat 1350  
 ctccacatcc tgcgggtggc atttaggggt gactccttca cacatactcc 1400  
 tcctctggat ccacaggaac tggatattct gaaaaccgta aaggaaatca 1450  
 cagggttttt gctgattcag gcttggcctg aaaacaggac ggacctccat 1500  
 gcctttgaga acctagaaat catacgcggc aggaccaagc aacatggtca 1550  
 gttttctctt gcagtcgtca gcctgaacat aacatccttg ggattacgct 1600  
 ccctcaagga gataagtgat ggagatgtga taatttcagg aaacaaaaat 1650  
 ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa aaactgtttg ggacctccgg 1700  
 tcagaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaaacagc tgcaaggcca 1750  
 cagggcaggc ctgccatgcc ttgtgctccc ccgagggctg ctggggcccg 1800  
 gagcccaggg actgctctc ttgccggaat gtcagccgag gcagggaatg 1850  
 cgtggacaag tgcaaccttc tggaggggtg gccaaaggag tttgtggaga 1900  
 actctgagtg catacagtgc caccagagt gcctgcctca ggccatgaac 1950  
 atcacctgca caggacgggg accagacaac tgtatccagt gtgccacta 2000  
 cattgacggc cccactgcg tcaagacctg ccggcagga gtcattgggag 2050  
 aaaacaacac cctggtctgg aagtacgcag acgccggcca tgtgtgccac 2100  
 ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actggggccag gtcttgaagg 2150  
 ctgtccaacg aatgggccta agatcccgtc catcgccact gggatggtgg 2200  
 gggccctcct cttgtgctg gtggtggccc tggggatogg cctcttcatg 2250  
 cgaaggcgcc acatcgttog gaagcgcacg ctgaggaggc tgctgcagga 2300  
 gagggagctt gtggagcctc ttacacccag tggagaagct cccaaccaag 2350  
 ctctcttgag gatcttgaag gaaactgaat tcaaaaagat caaagtgctg 2400  
 ggctccgggt cgttcggcac ggtgtataag ggactctgga tcccagaagg 2450  
 tgagaaagtt aaaattcccg tcgctatcaa ggaattaaga gaagcaacat 2500  
 ctccgaaagc caacaaggaa atcctcgatg aagcctacgt gatggccagc 2550  
 gtggacaacc cccacgtgtg ccgcctgctg ggcatctgcc tcacctccac 2600  
 cgtgcagctc atcacgcagc tcatgccctt cggctgcctc ctggactatg 2650  
 tccgggaaca caaagacaat attggtccc agtacctgct caactggtgt 2700

ES 2 564 127 T3

gtgcagatcg caaagggcat gaactacttg gaggaccgtc gcttgggtgca 2750  
 ccgcgacctg gcagccagga acgtactggt gaaaacaccg cagcatgtca 2800  
 agatcacaga ttttgggctg gccaaactgc tgggtgcgga agagaaagaa 2850  
 taccatgcag aaggaggcaa agtgcctatc aagtggatgg cattggaatc 2900  
 aattttacac agaatctata cccaccagag tgatgtctgg agctacgggg 2950  
 tgaccgtttg ggagttgatg acctttggat ccaagccata tgacggaatc 3000  
 cctgccagcg agatctcctc catcctggag aaaggagaac gcctccctca 3050  
 gccacccata tgtaccatcg atgtctacat gatcatggtc aagtgcctgga 3100  
 tgatagacgc agatagtgc ccaaagttcc gtgagttgat catogaattc 3150  
 tccaaaatgg ccgagaccc ccagcgctac cttgtcattc aggggggatga 3200  
 aagaatgcat ttgccaaagtc ctacagactc caacttctac cgtgccctga 3250  
 tggatgaaga agacatggac gacgtgggtg atgccgacga gtacctcatc 3300  
 ccacagcagg gcttcttcag cagccccctcc acgtcacgga ctcccctcct 3350  
 gagctctctg agtgcaacca gcaacaattc caccgtggct tgcattgata 3400  
 gaaatgggct gcaaagctgt cccatcaagg aagacagctt cttgcagcga 3450  
 tacagctcag accccacagg cgccttgact gaggacagca tagacgacac 3500  
 cttcctccca gtgcctgaat acataaacca gtccgttccc aaaaggcccg 3550  
 ctggctctgt gcagaatcct gtctatcaca atcagcctct gaaccccgcg 3600  
 cccagcagag acccacacta ccaggacccc cacagcactg cagtgggcaa 3650  
 ccccgagtat ctcaaacactg tccagcccac ctgtgtcaac agcacattcg 3700  
 acagccctgc cactgggccc cagaaaaggca gccaccaaat tagcctggac 3750  
 aacctgact accagcagga cttctttccc aaggaagcca agccaaatgg 3800  
 catctttaag ggctccacag ctgaaaatgc agaataccta agggtcgctc 3850  
 cacaaagcag tgaatttatt ggagcatgac cacggaggat agtatgagcc 3900  
 ctaaaaatcc agactctttc gataccagc accaagccac agcaggtcct 3950  
 ccatoccaac agccatgccc gcattagctc ttagaccac agactggttt 4000  
 tgcaacgttt acaccgacta gccaggaagt acttccacct cgggcacatt 4050  
 ttgggaagtt gcattccttt gtcttcaaac tgtgaagcat ttacagaaac 4100  
 gcatocagca agaataattgt ccctttgagc agaaatttat ctttcaaaga 4150  
 ggtatatttg aaaaaaaaaa aaagtatatg tgaggathtt tattgattgg 4200  
 ggatcttggg gtttttcatt gtcgctattg atttttactt caatgggctc 4250  
 ttccaacaag gaagaagctt gctggtagca cttgctaccc tgagttcatc 4300



ES 2 564 127 T3

caggccaac tgtgagcaag gagcacaagc cacaagtctt ccagaggatg 4350  
 cttgattcca gtggttctgc ttcaaggctt ccaactgcaa acactaaaga 4400  
 tccaagaagg ccttcatggc cccagcaggc cggatcggta ctgtatcaag 4450  
 tcatggcagg tacagtagga taagccactc tgtcccttcc tgggcaaaga 4500  
 agaaacggag gggatggaat tcttccttag acttactttt gtaaaaatgt 4550  
 ccccacggta cttactcccc actgatggac cagtggtttc cagtcatgag 4600  
 cgttagactg acttgtttgt cttccattcc attgttttga aactcagtat 4650  
 gctgcccctg tcttgctgtc atgaaatcag caagagagga tgacacatca 4700  
 aataataact cggattocag cccacattgg attcatcagc atttggaacca 4750  
 atagcccaca gctgagaatg tggaatacct aaggatagca ccgcttttgt 4800  
 tctcgcaaaa acgtatctcc taatttgagg ctccagatgaa atgcatcagg 4850  
 tcctttgggg catagatcag aagactacaa aatgaagct gctctgaaat 4900  
 ctcttttagc catcacccca acccccacaa attagtttgt gttacttatg 4950  
 gaagatagtt ttctcctttt acttcacttc aaaagctttt tactcaaaga 5000  
 gtatatgttc cctccaggtc agctgcccc aaaccccctc cttacgcttt 5050  
 gtcacacaaa aagtgtctct gccttgagtc atctattcaa gcacttacag 5100  
 ctctggccac aacagggcat tttacaggtg cgaatgacag tagcattatg 5150  
 agtagtgtgg aattcaggta gtaaataatga aactagggtt tgaaattgat 5200  
 aatgctttca caacatttgc agatgtttta gaaggaaaa agttccttcc 5250  
 taaaataatt tctctacaat tggaagattg gaagattcag ctagttagga 5300  
 gcccaacctt tttcctaate tgtgtgtgcc ctgtaacctg actggttaac 5350  
 agcagtcott tgtaaacagt gttttaaact ctocctagtca atatccacc 5400  
 catccaattt atcaaggaag aatgggttca gaaaatattt tcagcctaca 5450  
 gttatgttca gtcacacaca catacaaat gttccttttg cttttaaagt 5500  
 aatttttgac tcccagatca gtcagagccc ctacagcatt gttaagaaag 5550  
 tatttgattt ttgtctcaat gaaaataaaa ctatattcat ttocactcta 5600  
 aaaaaaaaa aaaaaa 5616

<210> 3  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 3

Lys Val Leu Gly Ser Gly  
 1 5

5

10

ES 2 564 127 T3

5  
 <210> 4  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4  
 aaagtgctgg gctccggt 18

10  
 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15  
 <400> 5  
 aaagtgctgt gctccggt 18

20  
 <210> 6  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

**Lys Val Leu Ala Ser Gly**  
 1 5

25  
 <210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

30  
 <400> 7  
 aaagtgctgg cctccggt 18

35  
 <210> 8  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40  
 <400> 8

**Lys Val Leu Cys Ser Gly**  
 1 5

45  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

**Glu Ile Leu Asp**

50  
 <210> 10  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

**gctatcaagg aattaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50**

**cctcgat 57**

5 <210> 11  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 11  
gctatcaaaa catctccgaa agccaacaag gaaatcctcg at 42

15 <210> 12  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 12  
gctatcaagc aaccaacatc tccgaaagcc aacaaggaaa tctcctgat 48

25 <210> 13  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 13  
gctatcaagg aatcgaaagc caacaaggaa atcctcgat 39

35 <210> 14  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 14  
gctatcaagg aattaagaga agcaaccctc gat 33

45 <210> 15  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 15

**gctatcaagg aattaagaga agcaacatct ccgaaagtca acaaggaaat 50**

**cctcgat 57**

55 <210> 16  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 16

**gctatcaagg aatcaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50**

**cctcgat 57**

65 <210> 17  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

ES 2 564 127 T3

gctatcaaga aattaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50

octcgat 57

5 <210> 18  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Met Ala Ser Val Asp Asn Pro  
1 5

10

<210> 19  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 19  
atggccagcg tggacaacc c 21

20

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

25

<400> 20  
atggccatag ccagcgtgga caacccc 27

30

<210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Met Ala Ile Ala Ser Val Asp Asn Pro  
1 5

35

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

40

<400> 22  
atggccagcg tggccagcgt ggataacccc 30

45

<210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

50

<400> 23

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

55

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

ES 2 564 127 T3

<400> 24  
atggccatcg tggacaaccc c 21

5 <210> 25  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 25  
**Met Ala Ile Val Asp Asn Pro**  
1 5

15 <210> 26  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 26  
**Phe Gly Leu Ala Lys Leu**  
1 5

25 <210> 27  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 27  
ttgggctgg ccaaactg 18

35 <210> 28  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 28  
ttgggcggg ccaaactg 18

45 <210> 29  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 29  
**Phe Gly Arg Ala Lys Leu**  
1 5

55 <210> 30  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 30  
ttgggccgg ccaaactg 18

65 <210> 31  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

70 <400> 31

ES 2 564 127 T3

**Phe Gly Pro Ala Lys Leu**  
 1 5

5 <210> 32  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 32  
 ggaattaaga 10

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

<400> 33  
 ggaattaaga gaagc 15

20 <210> 34  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 34  
 taagagaagc aacatctc 18

30 <210> 35  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35  
 ttaagagaag caacatct 18

35 <210> 36  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 36  
 taagagaagc aa 12

45 <210> 37  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 37  
 atctccgaaa gccacaagc aaat 24

55 <210> 38  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

**Lys Lys Lys Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly**  
 1 5 10 15

**Trp Leu Asp Phe**

60

# ES 2 564 127 T3

<210> 39  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

5  
<400> 39  
caaatgagct ggcaagtgcc gtgtc 25

10  
<210> 40  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15  
<400> 40  
gagtttccca aacctcagt gaaac 25

20  
<210> 41  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

25  
<400> 41  
gcaatatcag ccttaggtgc ggctc 25

30  
<210> 42  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

35  
<400> 42  
catagaaagt gaacatttag gatgtg 26

40  
<210> 43  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

45  
<400> 43  
ccatgagtac gtatttgaa actc 24

50  
<210> 44  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

55  
<400> 44  
catatcccca tggcaaactc ttgc 24

60  
<210> 45  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

65  
<400> 45  
ctaacgttcg ccagccataa gtcc 24

70  
<210> 46  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

75  
<400> 46  
gctgcgagct cacccagaat gtctgg 26

80  
<210> 47  
<211> 44

ES 2 564 127 T3

<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 47  
5 tgtaaaacga cggccagtca agtgccgtgt cctggcacc aagc 44

<210> 48  
<211> 42  
<212> ADN  
10 <213> *Homo sapiens*

<400> 48  
caggaaacag ctatgacccc aaacactcag tgaacaaaag ag 42

<210> 49  
<211> 39  
<212> ADN  
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 49  
20 tgtaaaacga cggccagtcc ttaggtgagg ctccacagc 39

<210> 50  
<211> 40  
25 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 50  
30 caggaaacag ctatgacc ca ttaggatgt ggagatgagc 40

<210> 51  
<211> 41  
<212> ADN  
35 <213> *Homo sapiens*

<400> 51  
tgtaaaacga cggccagtga aactcaagat cgcattcatg c 41

<210> 52  
<211> 41  
40 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 52  
45 caggaaacag ctatgaccgc aaactcttgc tatcccagga g 41

<210> 53  
<211> 40  
<212> ADN  
50 <213> *Homo sapiens*

<400> 53  
tgtaaaacga cggccagtca gccataagtc ctgcacgtgg 40

<210> 54  
<211> 42  
<212> ADN  
55 <213> *Homo sapiens*

<400> 54  
60 caggaaacag ctatgacc ca tctcccctg catgtgtaa ac 42

<210> 55  
<211> 23  
65 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*



# ES 2 564 127 T3

<400> 55  
tactggtgga gtattgata gtg 23

5 <210> 56  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 56  
ctgtatcaaa gaatgtcct g 21

15 <210> 57  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 57  
tgtaaaacga cggccagta gtgtattaac cttatgtg 38

25 <210> 58  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 58  
caggaaacag ctatgaccac ctctattgtt ggatcatatt cg 42

35 <210> 59  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 59  
tgtaaaacga cggccagt 18

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

<400> 60  
caggaaacag ctatgacc 18

**REIVINDICACIONES**

1. Un método

- 5 (i) para determinar el pronóstico de un paciente que tiene un tumor de cáncer pulmonar no microcítico, que comprende determinar en una muestra de dicho tumor la presencia o la ausencia de una mutación E746K, L747S o A755V en la proteína del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o un gen que codifica una mutación E746K, L747S o A755V en la proteína EGFR, mediante lo cual la presencia de dicha mutación en la proteína EGFR o de dicho gen que codifica dicha mutación en la proteína EGFR indica mejor pronóstico en comparación con la ausencia de dicha mutación en la proteína EGFR o de dicho gen que codifica dicha mutación en la proteína EGFR; o
- 10 (ii) de identificar un tumor de cáncer pulmonar no microcítico que es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR, que comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación E746K, L747S o A755V en la proteína EGFR o de un gen que codifica una mutación E746K, L747S o A755V en la proteína EGFR en una muestra del tumor, mediante lo cual la presencia de dicha mutación en la proteína EGFR o de dicho gen que codifica dicha mutación en la proteína EGFR indica que el tumor es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR.
- 15
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la presencia o la ausencia de un gen que codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta amplificando la región de ácido nucleico correspondiente a dicha mutación de la proteína EGFR en un gen EGFR y comparando la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética de la región correspondiente en un gen EGFR de tipo silvestre.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que la presencia o la ausencia de un gen que codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta amplificando la región de ácido nucleico correspondiente a dicha mutación en la proteína EGFR en un gen EGFR y secuenciando dicho ácido nucleico amplificado.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, en el que la presencia o la ausencia de un gen que codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta por reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo.
- 35 5. El método de la reivindicación 1, en el que la presencia o la ausencia de un gen que codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta amplificando los exones 18-21 del gen EGFR por PCR y secuenciando de forma bidireccional el producto de PCR.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, que comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación E746K en la proteína EGFR o de un gen que codifica una mutación E746K en la proteína EGFR.
- 45 7. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la presencia de dicha mutación en la proteína EGFR o de dicho gen que codifica dicha mutación en la proteína EGFR indica mejor pronóstico en comparación con la expresión de la proteína EGFR de tipo silvestre.
- 50 8. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el inhibidor de EGFR es cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
- 55 9. El método de la reivindicación 8, en el que el inhibidor de EGFR es erlotinib.
- 60 10. Un inhibidor de EGFR seleccionado entre el grupo que consiste en cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib, para su uso en un método de tratamiento de tumor de cáncer pulmonar no microcítico en un paciente humano, comprendiendo el método:
- (i) identificar un tumor de cáncer pulmonar no microcítico que es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR de acuerdo con el método de la reivindicación 1 (ii); y
- (ii) tratar a un paciente cuyo tumor de cáncer pulmonar no microcítico se ha identificado como susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR en la etapa (i) con dicho inhibidor de EGFR seleccionado entre el grupo que consiste en cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
- 65 11. El inhibidor de EGFR para uso de la reivindicación 10, en el que la presencia o la ausencia de un gen que codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta amplificando la región de ácido nucleico correspondiente a dicha mutación en la proteína EGFR en un gen EGFR y comparando la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética de la región correspondiente en un gen EGFR de tipo silvestre.
12. El inhibidor de EGFR para uso de la reivindicación 10, en el que la presencia o la ausencia de un gen que codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta amplificando la región de ácido nucleico correspondiente a dicha mutación en la proteína EGFR en un gen EGFR y secuenciando dicho ácido nucleico amplificado.
13. El inhibidor de EGFR para uso de la reivindicación 10, en el que la presencia o la ausencia de un gen que

codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta por reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo.

5 14. El inhibidor de EGFR para uso de la reivindicación 10, en el que la presencia o la ausencia de un gen que codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta amplificando los exones 18-21 del gen EGFR por PCR y secuenciando de forma bidireccional el producto de PCR.

10 15. El inhibidor de EGFR para uso de la reivindicación 10, en el que la etapa de identificación comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación E746K en la proteína EGFR o de un gen que codifica una mutación E746K en la proteína EGFR.

16. El inhibidor de EGFR para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, en el que la presencia de dicha mutación en la proteína EGFR o de dicho gen que codifica dicha mutación en la proteína EGFR indica mejor pronóstico en comparación con la expresión de la proteína EGFR de tipo silvestre.

15 17. El inhibidor de EGFR para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-16, que es erlotinib.

ES 2 564 127 T3

1 MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRALEEKKV CQGTSNKLTQ LGTFEDHFLS  
51 LQRMFNCEV VLGLEITYV QRNYDLSFLK TIQEVAGYVL IALNTVERIP  
101 LENLQIIRGN MYYENSYALA VLSNYDANKT GLKELPMRNL QEILHGAVRF  
151 SNNPALCNVE SIQWRDIVSS DFLSNMSMDF QNHLGSCQKC DPSCPNGSCW  
201 GAGEENCQKL TKIICAQQCS GRCRGKSPSD CCHNQCAAGC TGPRESDECLV  
251 CRKFRDEATC KDTCPPLMLY NPTTYQMDVN PEGKYSFGAT CVKKCPRNYV  
301 VTDHGSCVRA CGADSYEMEE DGVRKCKKCE GPCRKVCNGI GIGEFKDSLS  
351 INATNIKHFV NCTISISGLH ILPVAFRGDS FTHTPPLDPQ ELDILKTVKE  
401 ITGFLLIQAW PENRTDLHAF ENLEIIRGRT KQHGQFSLAV VSLNITSLGL  
451 RSLKEISDGD VIISGNKNLC YANTINWKKL FGTSGQKTKI ISNRGENSCK  
501 ATGQVCHALC SPEGCWGPEP RDCVSCRNVV RGRECVDKCN LLEGEPRFV  
551 ENSECIQCHP ECLPQAMNIT CTGRGPDNCI QCAHYIDGPH CVKTCPAGVM  
601 GENNTLVWKY ADAGHVCHLC HPNCTYGCTG PGLEGCPYNG PKIPSIATGM  
651 VGALLLLLIVV ALGIGLFMRR RHIVRKRTL RLLQERELVE PLTPSGEAPN  
701 QALLRILKET EFKKIKVLGS GAFGTVYKGL WIPEGEKVKI PVAIKELREA  
751 TSPKANKEIL DEAYVMASVD NPHVCRLGI CLTSTVQLIT QLMPFGCLLD  
801 YVREHKDNIG SQYLLNWCVQ IAKGMNYLED RRLVHRDLAA RNVLVKTPOH  
851 VKITDFGLAK LLGAEKEYH AEGGKVPIKW MALESILHRI YTHQSDVWSY  
901 GVTVWELMTF GSKPYDGIPA SEISSILEKG ERLPQPPICT IDVYMIMVKC  
951 WMIDADSRPK FRELIIEFSK MARDPQRYLV IQGDERMHL P SPTDSNFYRA  
1001 LMDEEDMDDV VDAEYLIPQ QGFFSSPSTS RTPLLSSLSA TSNNSTVACI  
1051 DRNGLQSCPI KEDSFLQRYV SDPTGALTED SIDDTFLPVP EYINQSVPKR  
1101 PAGSVQNPVY HNQPLNPAPS RDPHYQDPHS TAVGNPEYLN TVQPTCVNST  
1151 FDSPAHWAK GSHQISLDNP DYQQDFFPKE AKPNGIFKGS TAENAEYLRV  
1201 APQSSEFIGA

FIGURA 1

ES 2 564 127 T3

CCCCGGCGCAGCGCGGCCGAGCAGCCTCCGCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGACGCG 60  
GCCGAGGCGGCCGGAGTCCCAGCTAGCCCCGGCGGCCGCCGCCAGACCGGACGAC 120  
AGGCCACCTCGTCGGCGTCCGCCCCAGTCCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGC 180  
GCACGGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCTCTTCGGGGA 240  
GCAGCGATGCGACCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTC 300  
TGCCCCGGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAAGFTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTC 360  
ACGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCATTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGT 420  
GAGGTGGTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCTTC 480  
TTAAAGACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGA 540  
ATTCTTTGGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTIONGAAAATTCCTATGCC 600  
TTAGCAGTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAAACCGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGA 660  
AATTTACAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTTCCAGCAACAACCTGCCCTGTGCAAC 720  
GTGGAGAGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTCGATG 780  
GACTTCCAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGC 840  
TGCTGGGGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAAATCATCTGTGCCAGCAG 900  
TGCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCA 960  
GGCTGCACAGGCCCCCGGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGAAAATTCGAGACGAAGCC 1020  
ACGTGCAAGGACACCTGCCCCCACTCATGCTCTACAACCCACCACGTACCAGATGGAT 1080  
GTGAACCCCGAGGGCAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCCGTAAT 1140  
TATGTGGTGACAGATCACGGCTCGTGCCTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATG 1200  
GAGGAAGACGGCGTCCGCAAGTGTAAAGAAGTGCGAAGGGCCTTGCCGCAAGTGTGTAAC 1260  
GGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACAC 1320  
TTCAAAAAGTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGT 1380

Figura 2a

ES 2 564 127 T3

|   |      |
|---|------|
| GACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTA  | 1440 |
| AAGGAAATCACAGGGTTTTTGGCTGATTAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCAT  | 1500 |
| GCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTT  | 1560 |
| GCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGAT  | 1620 |
| GGAGATGTGATAATTTAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAA   | 1680 |
| AAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGC | 1740 |
| TGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCCG  | 1800 |
| GAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAG  | 1860 |
| TGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGC  | 1920 |
| CACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAAC  | 1980 |
| TGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA  | 2040 |
| GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCAC  | 2100 |
| CTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACG   | 2160 |
| AATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTG   | 2220 |
| GTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGGCGCCACATCGTTCGGAAGCGCACG | 2280 |
| CTGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCT  | 2340 |
| CCCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTGCTG   | 2400 |
| GGCTCCGGTGCCTTCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTT  | 2460 |
| AAAATTCCTCGTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAA     | 2520 |
| ATCCTCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCCGCTGCTG  | 2580 |
| GGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTC  | 2640 |
| CTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCAGTACCTGCTCAACTGGTGT   | 2700 |

Figura 2b

ES 2 564 127 T3

|   |      |
|---|------|
| GTGCAGATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTG  | 2760 |
| GCAGCCAGGAACGTACTGGTGAAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTG | 2820 |
| GCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATC  | 2880 |
| AAGTGGATGGCATTGGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGATGTCTGG  | 2940 |
| AGCTACGGGGTGACCGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGAATC  | 3000 |
| CCTGCCAGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAACGCCTCCCTCAGCCACCCATA  | 3060 |
| TGTACCATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGCTGGATGATAGACGCAGATAGTCGC  | 3120 |
| CCAAAGTTCGGTGAGTTGATCATCGAATTCTCCAAAATGGCCCGAGACCCCCAGCGCTAC  | 3180 |
| CTTGTCAATTCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCTACAGACTCCAACCTTCTAC | 3240 |
| CGTGCCCTGATGGATGAAGAAGACATGGACGACGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATC  | 3300 |
| CCACAGCAGGGCTTCTTCAGCAGCCCCTCCACGTACGGACTCCCCTCCTGAGCTCTCTG   | 3360 |
| AGTGCAACCAGCAACAATTCACCGTGGCTTGCATTGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGT   | 3420 |
| CCCATCAAGGAAGACAGCTTCTTGACGCGATACAGCTCAGACCCCAAGGGCGCCTTGACT  | 3480 |
| GAGGACAGCATAGACGACACCTTCTCCAGTGCCTGAATACATAAACCAGTCCGTTCCC    | 3540 |
| AAAAGGCCCGCTGGCTCTGTGCAGAATCCTGTCTATCACAAATCAGCCTCTGAACCCCGCG | 3600 |
| CCCAGCAGAGACCCACACTACCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTAT  | 3660 |
| CTCAAACTGTCCAGCCCACCTGTGTCAACAGCACATTCGACAGCCC'TGCCCACTGGGCC  | 3720 |
| CAGAAAGGCAGCCACCAAATTAGCCTGGACAACCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCC  | 3780 |
| AAGGAAGCCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTA  | 3840 |
| AGGGTCGCGCCACAAAGCAGTGAATTTATTGGAGCATGACCACGGAGGATAGTATGAGCC  | 3900 |
| CTAAAAATCCAGACTCTTTTCGATACCCAGGACCAAGCCACAGCAGGTCTCCATCCCAAC  | 3960 |
| AGCCATGCCCCGATTAGCTCTTAGACCCACAGACTGGTTTTGCAACGTTTACACCGACTA  | 4020 |
| GCCAGGAAGTACTTCCACCTCGGGCACATTTTGGGAAGTTGCATTCCCTTTGTCTTCAAAC | 4080 |
| TGTGAAGCATTTACAGAAACGCATCCAGCAAGAATATGTCCCTTTGAGCAGAAATTTAT   | 4140 |

Figura 2c

ES 2 564 127 T3

CTTTCAAAGAGGTATATTTGAAAAAAAAAAAAAGTATATGTGAGGATTTTTATTGATTGG 4200  
GGATCTTGGAGTTTTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAG 4260  
GAAGAAGCTTGTGGTAGCAC'TTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCCAACTGTGAGCAAG 4320  
GAGCACAAGCCACAAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTT 4380  
CCACTGCAAAACACTAAAGATCCAAGAAGGCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTA 4440  
CTGTATCAAGTCATGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCTGGGCAAAGA 4500  
AGAAACGGAGGGGATGGAATTC'TCC'TTAGACTTACTTTTTGTAAAAATG'CCCCACGGTA 4560  
CTTACTCCCCACTGATGGACCAGTGGTTTTCCAGTCATGAGCGTTAGACTGACTTGT'TTGT 4620  
CTTCCATTCCATTGT'TTTGAAACTCAGTATGCTGCCCCCTGTCTTGCTGT'CATGAAATCAG 4680  
CAAGAGAGGATGACACATCAAATAATAACTCGGATTCAGCCCACATTGGATT'CATCAGC 4740  
AT'TTGACCAATAGCCACAGCTGAGAATGTGGAATACCTAAGGATAGCACCGCT'TTGT 4800  
TCTCGCAAAAACGTATCTCCTAATTTGAGGCTCAGATGAAATGCATCAGGTCCTTTGGGG 4860  
CATAGATCAGAAGACTACAAAAATGAAGCTGCTCTGAAATCTCCTTTAGCCATCACCCCA 4920  
ACCCCCAAAATTAGTTTGTGT'FACTTATGGAAGATAGTTTTCTCCTTTTACTTCACTTC 4980  
AAAAGCTTTTTACTCAAAGAGTATATGTTCCCTCCAGGTCAGCTGCCCCCAAACCCCTC 5040  
CTTACGCTTTGT'CACACAAAAAGTGTCTCTGCCTTGAGTCATCTATTCAAGCACTTACAG 5100  
CTCTGGCCACAACAGGGCATT'TPACAGGTGCGAATGACAGTAGCATTATGAGTAGTGTGG 5160  
AATT'CAGGTAGTAAATATGAAACTAGGGTTTGAAATTGATAAATGCTTTCACAACATTTGC 5220  
AGATGTTTTAGAAAGCAAAAAACT'CCCTTCTAAAATAAATTTCT'CTACAATTGGAAGATTG 5280  
GAAGATTCAGCTAGTTAGGAGCCCACCTTTTTTCCTAATCTGTGTGTGCCCTGTAACCTG 5340  
ACTGGTTAACAGCAGTCC'TTTGTAAACAGTGT'TTTAAACTCTCC'TAGTCAATATCCACCC 5400  
CATCCAATTTATCAAGGAAGAAATGGTTCAGAAAATATTTTCAGCCTACAGTTATGTTCA 5460  
GTCACACACACATACAAAATGTTCC'TTTTGCTTTTAAAGTAATTTTTGACTCCCAGATCA 5520  
GTCAGAGCCCCTACAGCATTGT'TAAGAAAGTATTTGATTTTTGTCTCAATGAAAAATAAAA 5580  
CTATATTCATTTCCACTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 2d



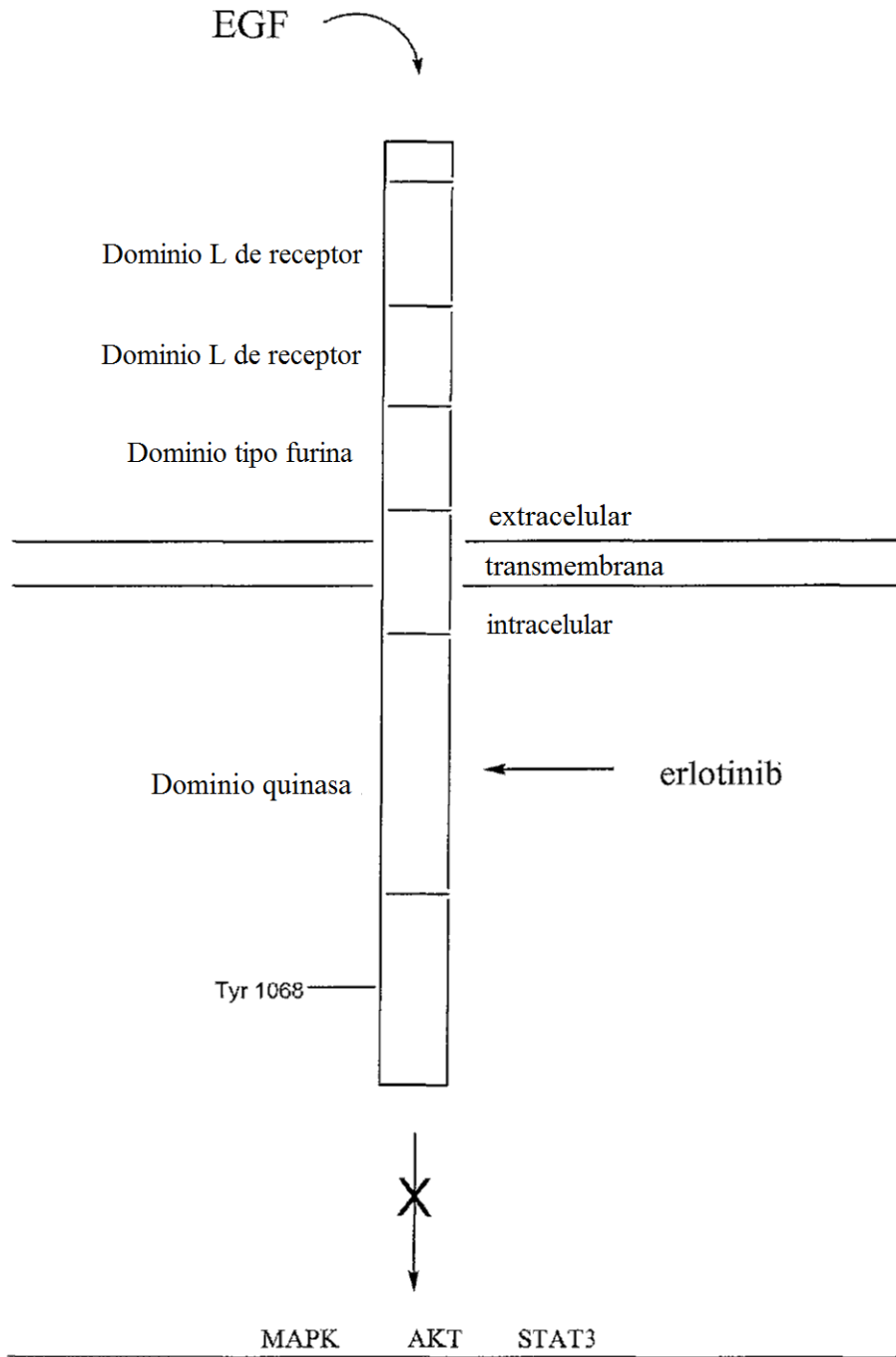


Figura 3

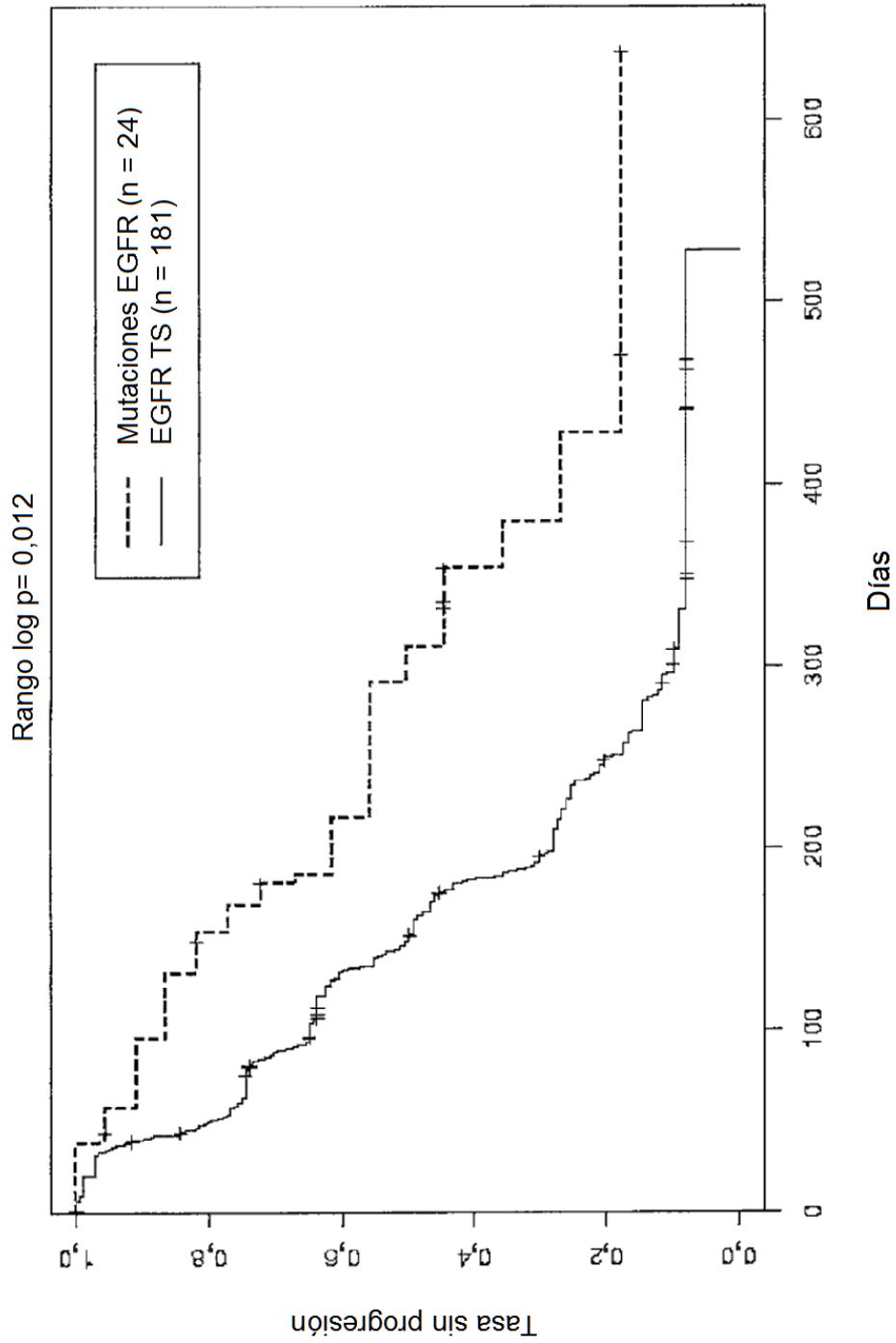


Figura 4

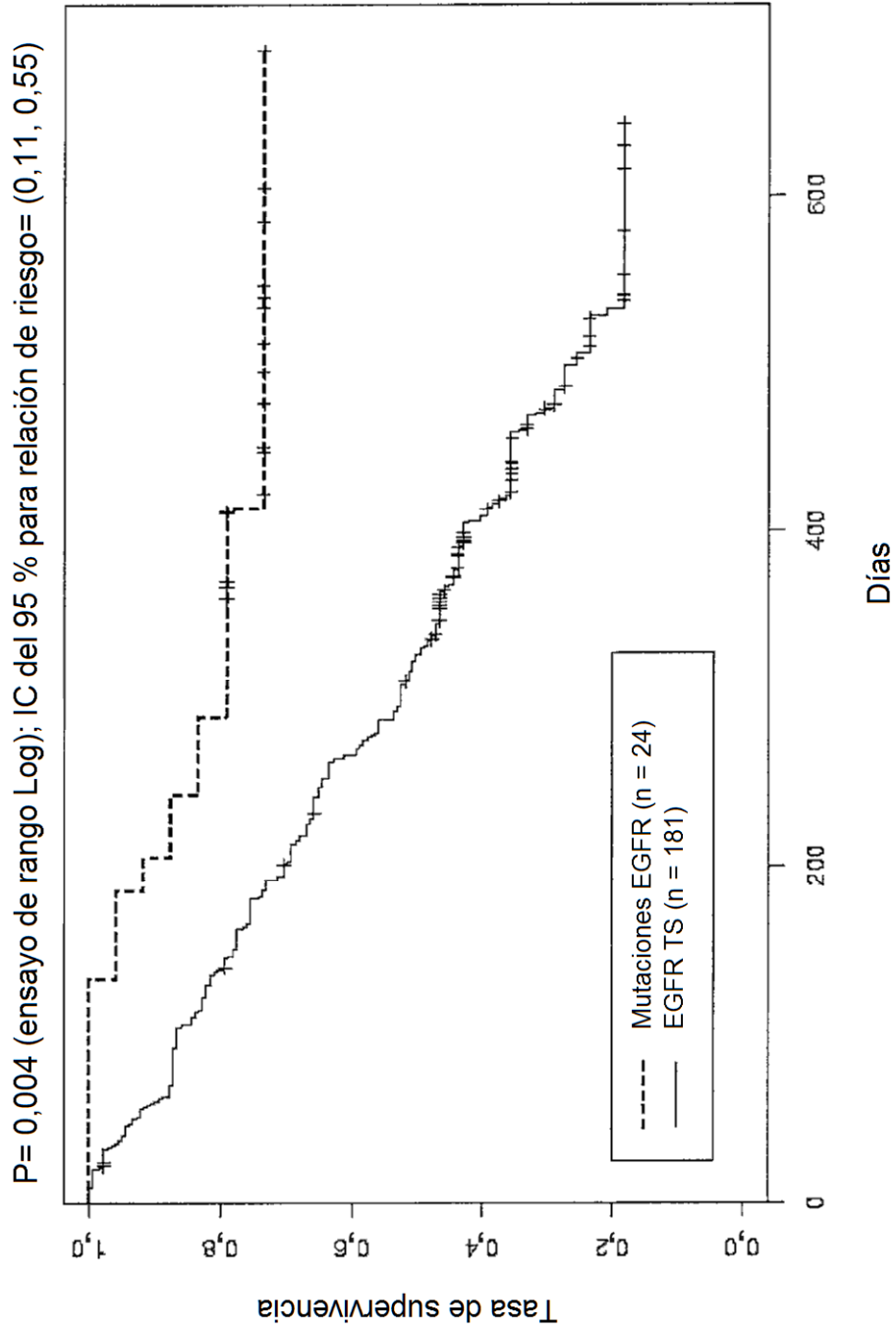


Figura 5

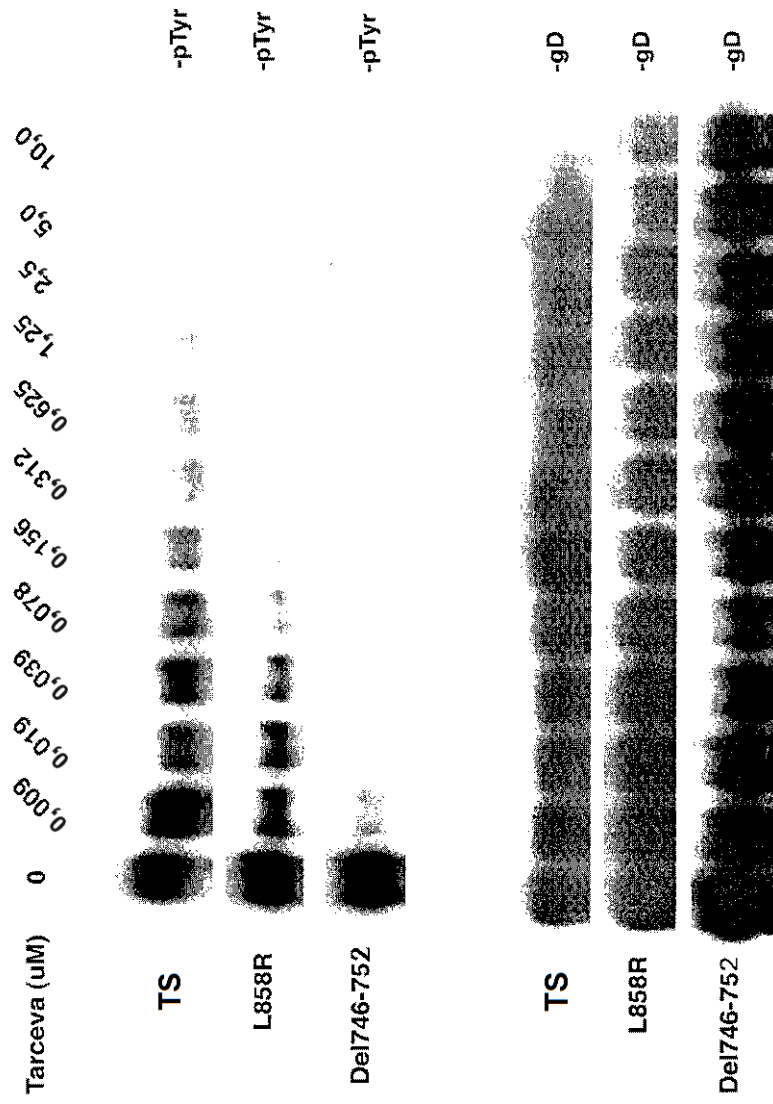


Figura 6

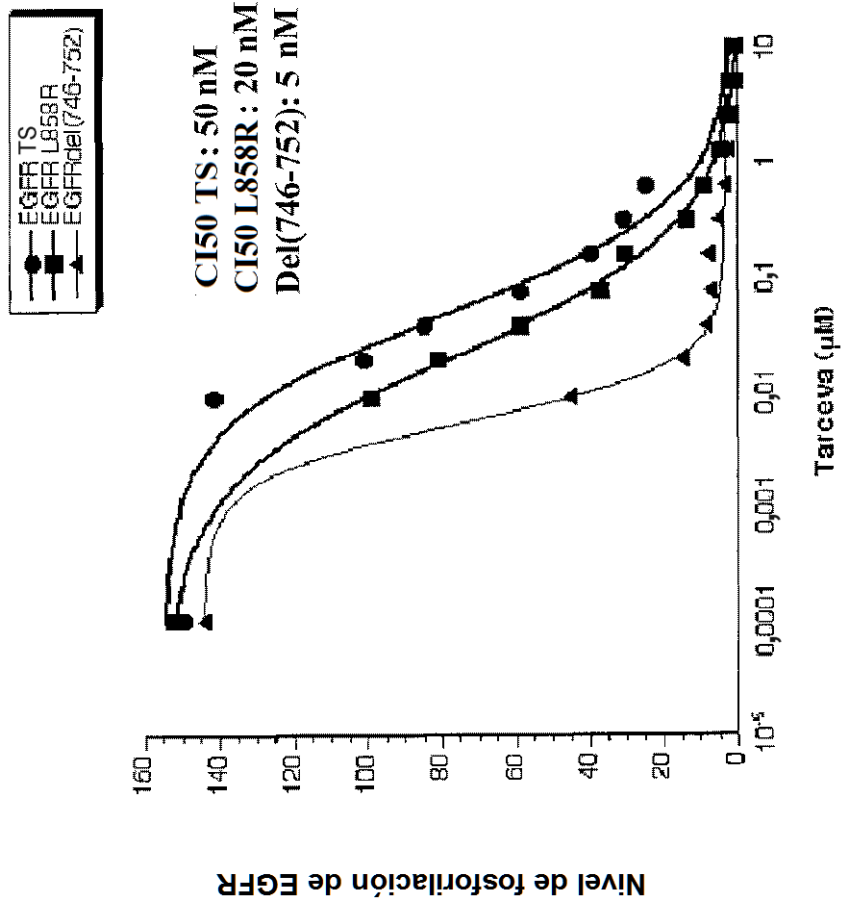


Figura 7

EXÓN 18

Proteína EGFR 716 K V L G S G (SEC ID N°: 3)  
 Gen EGFR 2392 AAAGTGTGGCTCCGGT (SEC ID N°: 4)  
 M1 (G719A) AAAGTGTGTGCTCCGGT {KVLASG}  
 (SEC ID N°: 5) (SEC ID N°: 6)  
 M2 (G719C) AAAGTGTGGCTCCGGT {KVLCSG}  
 (SEC ID N°: 7) (SEC ID N°: 8)

EXÓN 19

Proteína EGFR 743 A I K E L R E A T S P K A N K E I L D  
 (SEC ID N°: 9)  
 Gen EGFR 2473 GCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAAATCCTCGAT  
 (SEC ID N°: 10)  
 M3 (E746-A750del) GCTATCAA-----AACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAAATCCTCGAT  
 (SEC ID N°: 11)  
 M4 (E748-R748del E749Q A750P) GCTATCAAG-----CAAACAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAAATCCTCGAT  
 (SEC ID N°: 12)  
 M5 (L747S R748-P753del) GCTATCAAGGAAT-----CGAAAGCCAAACAAGGAAATCCTCGAT  
 (SEC ID N°: 13)  
 M6 (S752-I759del) GCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAAC-----CCTCGAT  
 (SEC ID N°: 14)  
 M11 (A755V) GCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGTCAACAAGGAAATCCTCGAT  
 (SEC ID N°: 15)  
 M12 (L747S) GCTATCAAGGAATCAACAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAAATCCTCGAT  
 (SEC ID N°: 16)  
 M13 (E746K) GCTATCAAGAAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAAATCCTCGAT  
 (SEC ID N°: 17)

Figura 8

EXÓN 20

Proteína EGFR 766 M A S V D N P (SEC ID N°: 18)  
 Gen EGFR 2542 ATGGCC-----AGCGTGGACAACCCC (SEC ID N°: 19)

M7 (M766-A767 AI ins) ATGGCCATA--GCCAGCGTGGACAACCCC {MAIASVDNP}  
 (SEC ID N°: 20) (SEC ID N°: 21)

M8 (S768-V769 SVA ins) ATGGCCAGCGTGGCCAGCGTGGATAACCCC {MASVASVDNP}  
 (SEC ID N°: 22) (SEC ID N°: 23)

M9 (S768I) ATGGCC-----ATCGTGGACAACCCC {MAIVDNP}  
 (SEC ID N°: 24) (SEC ID N°: 25)

EXÓN 21

Proteína EGFR 856 F G L A K L (SEC ID N°: 26)  
 Gen EGFR 2812 TTTGGGCTGGCCAAACTG (SEC ID N°: 27)

M10 (L858R) TTTGGGCGGGCCAAACTG {FGRAKL}  
 (SEC ID N°: 28) (SEC ID N°: 29)

M14 (L858P) TTTGGGCGGGCCAAACTG {FGPAKL}  
 (SEC ID N°: 30) (SEC ID N°: 31)

Figura 9