

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 674**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 12790790 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2776581**

54 Título: **Nuevas mutaciones complejas en el dominio quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico**

30 Prioridad:

**10.11.2011 US 201161558093 P**

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

**28.03.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LIU, WEI-MIN y  
TSAN, ALISON**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 564 674 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

Nuevas mutaciones complejas en el dominio quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere al diagnóstico del cáncer y a pruebas diagnósticas para las terapia del cáncer. En particular, la invención se refiere a la detección de mutaciones que resultan útiles para el diagnóstico y el pronóstico, así como para la predicción de la eficacia del tratamiento del cáncer.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE), también conocido como HER1 o ErbB1, es un miembro de la familia de la tirosina quinasa de tipo I de receptores de factor de crecimiento. Estas proteínas unidas a membrana presentan un dominio tirosina quinasa intracelular que interactúa con diversas rutas de señalización. Tras la unión de ligando, los receptores en dicha familia experimentan dimerización y posteriormente autofosforilación del dominio tirosina quinasa. La autofosforilación desencadena una cascada de sucesos en las rutas de señalización intracelular, incluyendo las rutas Ras/MAPK, PI3K y AKT. A través de estas rutas las proteínas de la familia de HER regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares.

20

Vario tumores malignos humanos se asocian a la expresión o función aberrante del RFCE (Mendelsohn *et al.*, The EGF receptor family as targets for cancer therapy, *Oncogene* 19:6550-6565, 2000). En particular, se ha demostrado que algunos cánceres incluyen mutaciones en el dominio quinasa del RFCE (exones 18 a 21). En el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), se ha demostrado que dichas mutaciones inducen rutas antiapoptóticas en las células malignas (Pao *et al.*, EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib", *P.N.A.S.* 101 (36):13306-13311, 2004; Sordella *et al.*, Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways, *Science* 305(5687):1163-1167, 2004).

25

Se han desarrollado terapias con diana en el RFCE. Por ejemplo, el cetuximab (ERBITUX™) y el panitumumab (VECTIBIX™) son anticuerpos anti-RFCE. El erlotinib (TARCEVA™) y el gefitinib (IRESSA™) son quinazolinas que resultan útiles como inhibidores selectivos oralmente activos de la RFCE tirosina quinasa. Dichos fármacos resultan máximamente efectivos en pacientes con cánceres controlados por la actividad aberrante del RFCE. Un estudio a gran escala aleatorizado de doble ciego de IRESSA™ (estudio IRESSA Pan-Asia Study (IPASS)) ha comparado el gefitinib con la quimioterapia tradicional como tratamiento de primera línea en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (Mok *et al.*, Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma, *N. Eng. J. Med.* 361:947-957, 2009). El IPASS ha estudiado 1.217 pacientes con histología confirmada de adenocarcinoma. El estudio ha revelado que la supervivencia sin progresión (SSP) era significativamente mayor para IRESSA™ que para la quimioterapia en pacientes con tumores positivos para mutación de RFCE. Lo contrario es cierto para los tumores en los que no se encontraba mutado el RFCE: la SSP era significativamente mayor para la quimioterapia que para IRESSA™. El estudio demostró que para mejorar la probabilidad de tratamiento con éxito de un paciente de cáncer de pulmón, debe conocerse la condición de mutación del RFCE.

30

35

40

45

El análisis del resultado clínico revela que los pacientes con tumores que portan mutaciones en el dominio quinasa del RFCE (exones 18 a 21) presentan una mejor respuesta al erlotinib que los tumores que expresan RFCE de tipo salvaje (patentes US nº 7.294.468 y nº 7.960.118). Estas mutaciones son predictivas de la respuesta a inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) tales como las quinazolinas erlotinib (TARCEVA™) y gefitinib (IRESSA™). Entre las mutaciones del RFCE, la delección de los aminoácidos 746 a 750 resulta especialmente común en los pacientes de cáncer de pulmón (ver la patente US nº 7.294.468 y Kosaka *et al.*, Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer, biological and clinical implications", *Cancer Res.* 64:8919-23, 2004). Kosaka *et al.* documentan un estudio con 277 pacientes de cáncer de pulmón japoneses. El estudio japonés reveló que se producían mutaciones del RFCE en el 40% de los adenocarcinomas de pulmón. Aproximadamente la mitad de las mutaciones (20% de los pacientes) eran delecciones en torno a los aminoácidos 746 a 750 (nucleótidos 2238 a 2250).

50

55

El documento nº US2006/0147959 da a conocer el diagnóstico de cáncer basado en mutaciones de RFCE, en el que algunas mutaciones confieren sensibilidad a los inhibidores de tirosina quinasa. Dicho documento no da a conocer las mutaciones de la presente invención.

60

Algunas mutaciones en el dominio de RFCE quinasa son comunes, mientras que otras se producen con menor frecuencia. Sin embargo, resulta esencial que un ensayo clínico de mutaciones de RFCE presente como diana el máximo número posible de mutaciones. Lo anterior garantizará que los pacientes con mutaciones raras no presenten un resultado de ensayo "falso negativo". En el caso de que se omita la detección de una mutación rara, el paciente portador de dicha mutación no recibirá un tratamiento que potencialmente podría salvar su vida. Por lo tanto, al descubrir una nueva mutación en el dominio de RFCE quinasa, la detección de dicha mutación presenta el potencial de afectar al resultado clínico en algunos pacientes.

65

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La invención se define en las reivindicaciones 1 a 9.

5 La exposición comprende además un método para detectar una mutación el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE) en una muestra de un ser humano, que comprende: poner en contacto el ácido nucleico en la muestra con un oligonucleótido capaz de hibridarse selectivamente con un ácido nucleico diana que contiene una mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1; incubar la muestra bajo  
10 condiciones que permitan la hibridación selectiva del oligonucleótido con el ácido nucleico diana, y detectar la hibridación.

Se da a conocer además un método de tratamiento de un paciente que presenta un tumor que posiblemente incluye células con una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE), que comprende  
15 solicitar que la muestra del paciente se someta a ensayo para la presencia del gen de RFCE mutado, caracterizado por una mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, y en el caso de que se informe de la presencia de alguna de las mutaciones, la administración en el paciente de un compuesto que inhibe la señalización de la proteína RFCE mutante codificada por el gen mutado. La exposición incluye un compuesto que  
20 inhibe la señalización de la proteína RFCE mutante codificada por el gen mutado para la utilización en el tratamiento de una enfermedad relacionada o causada por un tumor que posiblemente incluye células con una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE), que comprende solicitar que la muestra del paciente se someta a ensayo para la presencia del gen de RFCE mutado, caracterizado or una mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, y en el caso de que alguna de las mutaciones se informe como  
25 presente.

Se da a conocer un kit para detectar mutaciones en el gen de RFCE humano, incluyendo cualquier mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, comprendiendo el kit uno o más oligonucleótidos seleccionados de entre SEC ID nº 11 y nº 40.

La exposición incluye una mezcla de reacción para detectar mutaciones en el gen de RFCE humano, incluyendo cualquier mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, comprendiendo la mezcla  
35 de reacción uno o más oligonucleótidos seleccionados de entre SEC ID nº 11 y nº 40.

Se da a conocer además la utilización de oligonucleótidos seleccionados de entre SEC ID nº 11 y nº 40 para detectar mutaciones en el gen de RFCE humano seleccionadas de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1. La exposición incluye la utilización de la detección de las mutaciones en el gen de RFCE humano seleccionadas de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, en el diagnóstico o el pronóstico del cáncer. Una variación adicional es la utilización de la detección de las mutaciones en el gen de RFCE humano seleccionadas de entre la lista que  
40 consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, en el diseño del tratamiento de un paciente de cáncer o en la predicción de la respuesta del paciente de cáncer al tratamiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 La FIG. 1 (1A-1C) muestra la SEC ID nº 1, la secuencia de ADNc del RFCE de tipo salvaje.  
La FIG. 2 muestra la SEC ID nº 2, la secuencia de aminoácidos del RFCE de tipo salvaje.  
La FIG. 3 muestra la SEC ID nº 3, la secuencia de tipo salvaje de los nucleótidos 2221 a 2260 del gen RFCE, y la  
55 SEC ID nº 4, la mutación 2236\_2248>ACCC.  
La FIG. 4 muestra la SEC ID nº 3, la secuencia de tipo salvaje de los nucleótidos 2221 a 2260 del gen RFCE, y la SEC ID nº 5, la mutación 2237\_2244>CGCCC.  
La FIG. 5 muestra la SEC ID nº 6, la secuencia de tipo salvaje de los nucleótidos 2221 a 2280 del gen RFCE, y la  
60 SEC ID nº 7, la mutación 2252\_2277>AC.  
La FIG. 6 muestra la SEC ID nº 6, la secuencia de tipo salvaje de los nucleótidos 2221 a 2280 del gen RFCE, y la SEC ID nº 8, la mutación 2240\_2264>CGAAAGA.  
65 La FIG. 7 muestra la SEC ID nº 3, la secuencia de tipo salvaje de los nucleótidos 2221 a 2260 del gen RFCE, y la SEC ID nº

9, la mutación 2239\_2240 TT>CC.

La FIG. 8 muestra la SEC ID n° 6, la secuencia de tipo salvaje de los nucleótidos 2221 a 2280 del gen RFCE, y la SEC ID n°

10, la mutación 2264 C>A.

5

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

10 Con el fin de facilitar la comprensión de la presente exposición, se proporcionan las definiciones siguientes de los términos utilizados en la presente memoria.

15 El término "n\_m" o "n-m del" se refiere a una mutación que resulta en un ácido nucleico que no presenta los nucleótidos entre las posiciones "n" y "m". El término "n\_m>XYZ" se refiere a una mutación compleja en la que el ácido nucleico no presenta los nucleótidos entre las posiciones "n" y "m" sino que la secuencia de nucleótidos XYZ está insertada en su lugar. Por ejemplo, el término "2236\_2248>ACCC" se refiere a una mutación que resulta en un ácido nucleico que no presenta los nucleótidos 2236 a 2248 sino que la secuencia de nucleótidos ACCC se encuentra insertada en el lugar de los nucleótidos delecionados.

20 El término "nX>Y" se refiere a una mutación que resulta en una sustitución del nucleótido X en la posición "n" por el nucleótido Y. Por ejemplo, el término "2264C>A" se refiere a una mutación que resulta en una sustitución de una citosina en la posición 2264 por una adenina. De manera similar, el término "2239\_2240TT>CC" se refiere a una mutación que resulta en una sustitución de dos timinas en las posiciones 2239 y 2240 por dos citosinas.

25 La expresión "cebador específico de alelo" o "cebador EA" se refiere a un cebador que se hibrida con más de una variante de la secuencia diana pero que es capaz de discriminar entre las variantes de la secuencia diana en el aspecto de que únicamente con una de las variantes, el cebador es extendido eficientemente por el ácido nucleico polimerasa bajo condiciones adecuadas. Con otras variantes de la secuencia diana, la extensión resulta menos eficiente, ineficiente o indetectable.

30 La expresión "cebador común" se refiere al segundo cebador en la pareja de cebadores que incluye un cebador específico de alelo. El cebador común no es específico de alelo, es decir, no discrimina entre las variantes de la secuencia diana entre las que discrimina el cebador específico de alelo.

35 Los términos "complementario" o "complementariedad" se utilizan en referencia a cadenas antiparalelas de polinucleótidos relacionados con las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Las expresiones "perfectamente complementarias" o "100% complementarias" se refieren a secuencias complementarias que presentan apareamiento de Watson-Crick en todas las bases entre las cadenas antiparalelas, es decir, no hay desapareamientos entre cualesquiera dos bases en el dúplex polinucleótido. Sin embargo, los dúplex se forman entre cadenas antiparalelas incluso en ausencia de complementariedad perfecta. Las expresiones "parcialmente complementarias" o "incompletamente complementarias" se refieren a cualquier alineación de bases entre cadenas polinucleótidas antiparalelas que es menos de 100% perfecta (por ejemplo existe por lo menos un desapareamiento o base no correspondiente en el dúplex polinucleótido). Los dúplex entre cadenas parcialmente complementarias generalmente son menos estables que los dúplex entre cadenas perfectamente complementarias.

45 El término "muestra" se refiere a cualquier composición que contiene o que se presume que contiene ácidos nucleicos. Lo anterior incluye una muestra de tejido o líquido aislada de un individuo, por ejemplo piel, plasma, suero, líquido espinal, líquido linfático, líquido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, órganos y tumores, y también muestras de cultivos in vivo establecidos a partir de células obtenidas de un individuo, incluyendo los tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina (FFPET) y ácidos nucleicos aislados a partir de los mismos.

50 Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se utilizan intercambiamente. El término "oligonucleótido" se utiliza en ocasiones para referirse a un polinucleótido más corto. Un oligonucleótido puede comprender por lo menos 6 nucleótidos, por ejemplo por lo menos aproximadamente 10 a 12 nucleótidos, o por lo menos aproximadamente 15 a 30 nucleótidos correspondiente a una región de la secuencia de nucleótidos designada.

55 La expresión "secuencia primaria" se refiere a la secuencia de nucleótidos en un polinucleótido u oligonucleótido. Las modificaciones de nucleótidos, tales como las modificaciones de las bases nitrogenadas, las modificaciones de azúcares u otras modificaciones del esqueleto no son una parte de la secuencia primaria. Los marcajes, tales como cromóforos conjugados con los oligonucleótidos, tampoco son una parte de la secuencia primaria. De esta manera, dos oligonucleótidos pueden compartir la misma secuencia primaria pero diferir con respecto a las modificaciones y etiquetas.

60 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis a lo largo de una cadena complementaria del ácido nucleico bajo condiciones adecuadas para dicha síntesis. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y habitualmente

65

se encuentra marcada detectablemente. La sonda puede presentar modificaciones, tales como una modificación 3'-terminal que provoca que la sonda sea no extensible por las ácido nucleico polimerasas y uno o más cromóforos. Un oligonucleótido con la misma secuencia puede servir como cebador en un ensayo y una sonda en un ensayo diferente.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencia diana", "ácido nucleico diana" o "diana" se refiere a una parte de la secuencia de ácidos nucleicos que debe amplificarse, detectarse o ambas.

10 Los términos "hibridado" e "hibridación" se refieren a la interacción de apareamiento de bases entre dos ácidos nucleicos que resulta en la formación de un dúplex. No es un requisito que dos ácidos nucleicos presenten una complementariedad de 100% a lo largo de su longitud completa para conseguir la hibridación. Las expresiones "hibridación selectiva" e "hibridación específica" se refieren a la hibridación de un ácido nucleico predominantemente (50% o más de la molécula hibridante) o prácticamente de manera exclusiva (90% o más de la molécula hibridante) con un ácido nucleico particular presente en una mezcla compleja en la que también se encuentran presentes otros ácidos nucleicos. Por ejemplo, bajo condiciones de PCR típicas, los cebadores se hibridan específicamente con los ácidos nucleicos diana con exclusión de los ácidos nucleicos no diana también presentes en la solución. Los cebadores hibridados específicamente controlan la amplificación del ácido nucleico diana, produciendo un producto de amplificación del ácido nucleico diana que es por lo menos el producto de amplificación predominante y preferentemente el producto de amplificación prácticamente exclusivo (por ejemplo que representa 90% o más de todos los productos de amplificación en la muestra). Preferentemente el producto de amplificación no específico se encuentra presente en cantidades tan pequeñas que es no detectable o que se detecta en cantidades tan pequeñas que resulta fácilmente distinguible del producto de amplificación específico. De manera similar, las sondas se hibridan específicamente con los ácidos nucleicos diana con exclusión de los ácidos nucleicos no diana también presentes en la mezcla de reacción. Los cebadores hibridados específicamente permiten la detección específica del ácido nucleico diana, generando una señal detectable que es por lo menos la señal predominante y preferentemente la señal de amplificación prácticamente exclusiva (por ejemplo que representa 90% o más de todos los productos de amplificación en la muestra).

30 La presente exposición describe una nueva mutación en el dominio quinasa de RFCE que resulta útil para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer, permitiendo el diseño de un régimen de terapia y que predice el éxito de la terapia.

35 La numeración de los nucleótidos utilizada en la presente memoria hace referencia a la SEC ID nº 1, mostrada en la figura 1. En la SEC ID nº 1, la parte de la secuencia entre los nucleótidos 2221 y 2280, que comprende las seis mutaciones indicadas en la presente memoria, se encuentra resaltada y subrayada.

40 La numeración de los aminoácidos utilizada en la presente memoria hace referencia a la SEC ID nº 2, mostrada en la figura 2. En la SEC ID nº 2, la secuencia de señal incluye los aminoácidos 1 a 24, el dominio extracelular incluye los aminoácidos 24 a 645, el dominio transmembranal incluye los aminoácidos 646 a 668 y el dominio citoplasmático incluye los aminoácidos 669 a 1210, de entre los que el dominio de tirosina quinasa está constituido por los aminoácidos 718 a 964, y el sitio de fosforilación de la treonina es el aminoácido 678.

45 El presente estudio ha identificado seis mutaciones en el exón 19 (parte del dominio quinasa) del gen de la RFCE humana. Las mutaciones se ilustran en las figuras 3 a 8. En las figuras, se ha subrayado la secuencia delecionada del gen de tipo salvaje. La secuencia insertada en el gen mutante en lugar de la deleción se muestra en itálica y negrita. Las mutaciones también se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: nuevas mutaciones y secuencias de tipo salvaje en el exón 19 del gen de RFCE humano

SEC ID nº		SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS
3	WT 2221-2260	CCCGTGCCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGA
4	Mut 2236_2248>ACCC	CCCGTGCCTATCAAG <u>ACCC</u> CAACATCTCCGA
5	Mut 2237_2244>CGCCC	CCCGTGCCTATCAAGGC <u>CGCCC</u> GAAGCAACATCTCCGA
6	WT 2221-2280	CCCGTGCCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTC
7	Mut 2252_2277>AC	CCCGTGCCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAA <u>ACCTC</u>
8	Mut 2240-2264>CGAAAGA	CCCGTGCCTATCAAGGAAT <u>CGAAAGA</u> CAAGGAAATCCTC
9	Mut 2239_2240 TT>CC	CCCGTGCCTATCAAGGAA <u>CCA</u> AGAGAAGCAACATCTCCGA
10	Mut 2264 C>A	CCCGTGCCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAG <u>ACA</u> ACAAGGAAATCCTC

La primera mutación 2236\_2248>ACCC se muestra en la figura 3. La figura 3 muestra el fragmento de la secuencia de nucleótidos de la RFCE de tipo salvaje (SEC ID nº 3) y el fragmento correspondiente codificante de la mutación 2236\_2248>AC-CC (SEC ID nº 4).

5 La segunda mutación 2237\_2244>CGCCC se muestra en la figura 4. La figura 4 muestra el fragmento de la secuencia de nucleótidos de la RFCE de tipo salvaje (SEC ID nº 3) y el fragmento correspondiente codificante de la mutación 2237\_2244>CGCCC (SEC ID nº 5).

10 La tercera mutación 2252\_2277>AC se muestra en la figura 5. La figura 5 muestra el fragmento de la secuencia de nucleótidos de la RFCE de tipo salvaje (SEC ID nº 6) y el fragmento correspondiente codificante de la mutación 2252\_2277>AC (SEC ID nº 7).

15 La cuarta mutación 2240\_2264>CGAAAGA se muestra en la figura 6. La figura 6 muestra el fragmento de la secuencia de nucleótidos de la RFCE de tipo salvaje (SEC ID nº 6) y el fragmento correspondiente codificante de la mutación 2240\_2264>CGAAAGA (SEC ID nº 8). La quinta mutación 2239\_2240 TT>CC se muestra en la figura 7. La figura 7 muestra el fragmento de la secuencia de nucleótidos de la RFCE de tipo salvaje (SEC ID nº 3) y el fragmento correspondiente codificante de la mutación 2239\_2240 TT>CC (SEC ID nº 9).

20 La sexta mutación 2264 C>A se muestra en la figura 8. La figura 8 muestra el fragmento de la secuencia de nucleótidos de la RFCE de tipo salvaje (SEC ID nº 6) y el fragmento correspondiente codificante de la mutación 2264 C>A (SEC ID nº 10).

25 En una realización, la presente exposición comprende oligonucleótidos para detectar mutaciones en el exón 19 de RFCE seleccionadas de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1. En una realización, la exposición comprende oligonucleótidos (SEC ID nº 11 a nº 40) para detectar las mutaciones anteriormente indicadas mediante PCR específica de alelo (Tabla 2) (la PCR específica de alelo ha sido descrita en la patente US nº 6.627.402). Tal como se indica en la Tabla 2, los oligonucleótidos SEC ID nº 12 a 14, 17 a 20, 23 a 25, 28 a 30, 33 a 35, 37 y 38 son selectivos, es decir cebadores específicos de alelo. Algunos de dichos cebadores específicos de alelos contienen desapareamientos internos con la secuencia diana tanto de tipo salvaje como mutante. Se ha demostrado que algunos desapareamientos adicionales en los cebadores de PCR específica de alelo incrementan la selectividad de los cebadores; ver la publicación de patente US nº 2010/0099110. Otros oligonucleótidos en la Tabla 2, SEC ID nº 11, 15, 16, 21, 26, 27, 31, 32 y 36 no son selectivos, es decir no son específicos de alelo. Estos oligonucleótidos dirigen la amplificación del molde tanto mutante como de tipo salvaje. Dichos cebadores selectivos y no selectivos de la presente invención se denominan arbitrariamente cebadores "directos". Para la amplificación exponencial, dichos cebadores pueden aparearse con un segundo cebador "inverso" que no es específico de alelo, por ejemplo SEC ID nº 40. Para la detección basada en sondas, puede utilizarse una sonda, por ejemplo la SEC ID nº 39. El experto en la materia entenderá que las SEC ID nº 39 y nº 40 son ejemplos no limitativos. También puede utilizarse un cebador inverso diferente y una sonda diferente con un cebador directo seleccionado de entre las SEC ID nº 11 a nº 40.

40

Tabla 2

Oligonucleótidos para detectar nuevas mutaciones en el exón 19 de RFCE		
Descripción	SEC ID nº	Secuencia 5'-3'
Mutación 2240_2264>CGAAAGA		
Cebador directo común	11	AATCCCGTCGCTATCAAGGAA
Cebador directo selectivo	12	TTCCCGTCGCTATCAAGGAATC
Cebador directo selectivo	13	CCGTCGCTATCAAGGAATCGAA
Cebador directo selectivo	14	GTCGCTATCAAGGAATCGAAAGACAA
Cebador directo común	15	CAACAAGGAAATCCTCGATGTGAGT
Mutación 2252_2277>AC		
Cebador directo común	16	GTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCA
Cebador directo selectivo	17	GTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAAA
Cebador directo selectivo	18	CGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAAAC
Cebador directo selectivo	19	CTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAAACCT
Cebador directo selectivo	20	CTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAAACCTC
Cebador directo común	21	TCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCT
Mutación 2236_2248>ACCC		
Cebador directo común	22	AAAGTTAAAATCCCGTCGCTATCAA
Mutación 2236_2248>ACCC		
Cebador directo selectivo	23	AGTTAAAATCCCGTCGCTATCAAGA
Cebador directo selectivo	24	GTAAAATCCCGTCGCTATCAAGAC
Cebador directo selectivo	25	CCGTCGCTATCAAGACCCCA
Cebador directo común	26	CAACATCTCCGAAAGCCAACAA
Mutación 2237_2244>CGCCC		

Cebador directo común	27	AAAGTTAAAATCCCGTCGCTATCAA
Cebador directo selectivo	28	AAGTTAAAATCCCGTCGCTATCAAGGC
Cebador directo selectivo	29	CCGTCGCTATCAAGGCCG
Cebador directo selectivo	30	CGCTATCAAGGCCGCCGA
Cebador directo común	31	GAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA
Mutación 2264C>A		
Cebador directo común	32	GGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAA
Cebador directo selectivo	33	ATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGA
Cebador directo selectivo	34	ATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAFGA
Cebador directo selectivo	35	ATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAFGAC
Mutación 2239_2240TT>CC		
Cebador directo común	36	TTAAAATCCCGTCGCTATCAAGGA
Cebador directo selectivo	37	TAAAATCCCGTCGCTATCAAGGAAC
Cebador directo selectivo	38	AATCCCGTCGCTATCAAGGAACC
Oligonucleótidos adicionales		
Sonda	39	MATGGCTCQTGAACCTCAGGCCACCTTTP
Cebador inverso	40	AGAGCAGAGCAGCTGCCAGA
<p><u>Cebador común</u> = un cebador que amplifica el ácido nucleico tanto mutante como de tipo salvaje  <u>Cebador selectivo</u> = un cebador que amplifica únicamente el ácido nucleico mutante y no el de tipo salvaje  E = N4-<i>terc</i>-butil-bencil-dC  F = N6-<i>terc</i>-butil-bencil-dA  M = FAM  Q = BHQ2  P = fosfato</p>		

Para la extensión con éxito de un cebador, el cebador necesita presentar una complementariedad por lo menos parcial con la secuencia diana. Generalmente, la complementariedad en el extremo 3' del cebador resulta más crítica que la complementariedad en el extremo 5' del cebador (Innis *et al.*, editores, PCR Protocols, Academic Press, capítulo, páginas 9 a 11, 1990). Lo anterior implica que las variaciones del extremo 5', es decir, las adiciones, sustituciones o eliminación de nucleótidos en el extremo 5', no afectan al rendimiento de un cebador en un ensayo de PCR. Por lo tanto, la presente exposición comprende los cebadores dados a conocer en la Tabla 2 así como las variantes de dichos cebadores con variaciones en el extremo 5'. De manera similar, para la hibridación con éxito de una sonda, ésta necesita presentar una complementariedad por lo menos parcial con la secuencia diana. Generalmente la complementariedad próxima a la parte central de la sonda resulta más crítica que la complementariedad en los extremos de la sonda (Innis *et al.*, capítulo 32, páginas 262-267). Lo anterior implica que las variaciones de los extremos de la sonda, es decir, las adiciones, sustituciones o eliminación de nucleótidos de unos cuantos nucleótidos no afectan al rendimiento de la sonda durante la hibridación. Por lo tanto, la presente exposición comprende la sonda dada a conocer en la Tabla 2 así como las variantes de dichas sondas con variaciones terminales.

En otras variaciones de dicha realización, la sonda presenta una estructura particular, incluyendo un ácido proteínico nucleico (APN), un ácido nucleico bloqueado (ANB), una sonda baliza molecular (Tyagi *et al.*, Nat. Biotechnol. 3:303-308, 1996) o cebadores con sonda incorporada SCORPIONS® (Whitcome *et al.*, Nat. Biotechnol. 8:804-807, 1999). Una sonda puede marcarse con un marcaje radioactivo, fluorescente o cromóforo. Por ejemplo, las mutaciones pueden detectarse mediante reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo en tiempo real, en la que la hibridación de una sonda con el producto de amplificación resulta en la digestión enzimática de la sonda y la detección de los productos de digestión (sonda TaqMan™, Holland *et al.*, PNAS USA 88:7276-7280, 1991). La hibridación entre la sonda y la diana también puede detectarse mediante la detección del cambio de la fluorescencia debido a la formación de dúplex de ácidos nucleicos (publicación de patente US nº 2010/0143901) o mediante la detección de la temperatura de fusión característica del híbrido entre sonda y diana (patente US nº 5.871.908).

El gen o producto génico RFCE mutante puede detectarse en tumores o en otras muestras del cuerpo, tales como orina, esputo o suero. Las mismas técnicas comentadas anteriormente para la detección de genes o productos génicos RFCE mutantes en muestras de tumor pueden aplicarse a otras muestras del cuerpo. Por ejemplo, las células de cáncer pueden desprenderse de tumores y aparecer en dichas muestras corporales. Los métodos de detección de ácidos nucleicos del estado de la técnica son capaces de detectar células mutantes sobre un fondo de células no tumorales en una amplia diversidad de tipos de muestra.

En otra realización, la exposición es un método de tratamiento de un paciente que presenta un tumor que posiblemente incluye células con un gen de RFCE con mutaciones en el exón 19, seleccionadas de entre el grupo que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, comprendiendo el método la solicitud de que el paciente se someta a ensayo para una o más de las mutaciones anteriormente indicadas en la muestra del paciente, y, en el caso de que se

detecte la mutación, se administre en el paciente un inhibidor de tirosina quinasa (ITQ) o un inhibidor de RFCE. Dicha realización incluye un inhibidor de tirosina quinasa (ITQ) o un inhibidor de RFCE que inhibe la señalización de la proteína RFCE mutante codificada por el gen mutado, para la utilización en el tratamiento de una enfermedad relacionada o causada por un tumor que posiblemente incluye células con una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE), que comprende solicitar que la muestra del paciente se someta a ensayo para la presencia del gen de RFCE mutado, caracterizado por una mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, y en el caso de que alguna de las mutaciones se informe como presente. En variaciones de dicha realización, los inhibidores de tirosina quinasa son inhibidores de la RFCE quinasa tales como, por ejemplo, cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.

En una variación de dicha realización, el método comprende además investigar la presencia de una o más de las mutaciones siguientes: G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-I759 del T ins, S752-I759 del, P753-K757 del, D770-N771 del NPG ins, D770-N771 del SVD ins, P772-H773 dup, P772-H773 del V ins, M766-A767 del AI ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y y E746-A750 del AP ins; y en el caso de encontrarse presente una o más de las mutaciones, se administra en el paciente un compuesto que inhibe la señalización de la proteína RFCE mutante codificada por el gen mutado. Los cambios de nucleótidos que causan las mutaciones listadas anteriormente y los métodos de detección de los mismos se dan a conocer en las patentes US nº 7.294.468 y nº 7.960.118 y en la solicitud de patente US nº de ser. 13/280.976, presentada el 25 de octubre de 2011 (mutación E746-A750 del AP ins). Pueden detectarse múltiples mutaciones simultánea o separadamente mediante la utilización de hibridación con múltiples sondas, por ejemplo en un formato de transferencia por puntos o de matriz de ácidos nucleicos, PCR multiplex, por ejemplo PCR específica de alelo multiplex y PCR multiplex seguida de un ensayo de fusión de sonda con cada sonda caracterizada por una temperatura de fusión específica de la mutación. También pueden detectarse múltiples mutaciones mediante secuenciación de alto rendimiento, por ejemplo utilizando un método que implica la amplificación por PCR en emulsión de moléculas individuales adheridas a un soporte sólido, la posterior secuenciación mediante síntesis y análisis bioinformático de datos de secuencias, tal como el método desarrollado por 454 Life Sciences, Inc. (Branford, Conn.).

En otra realización, la invención es un método de determinación de una respuesta alterada de un paciente que presenta un tumor maligno frente a inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) o inhibidores de RFCE. El método comprende investigar la presencia en la muestra del paciente de una o más mutaciones en el exón 19 de RFCE seleccionadas de entre el grupo que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, y en caso de hallarse la mutación, determinar que el tratamiento es probable que tenga éxito. En variaciones de dicha realización, los inhibidores de tirosina quinasa son inhibidores de la RFCE quinasa o inhibidores de RFCE, por ejemplo cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.

En una variación de dicha realización, el método comprende además investigar la presencia de una o más de las mutaciones siguientes: G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-I759 del T ins, S752-I759 del, P753-K757 del, D770-N771 del NPG ins, D770-N771 del SVD ins, P772-H773 dup, P772-H773 del V ins, M766-A767 del AI ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y y E746-A750 del AP ins; y en caso de encontrarse presente una o más de las mutaciones, determinar que el tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa es probable que tenga éxito.

En todavía otra realización, la invención es un kit que contiene los reactivos necesarios para detectar una o más mutaciones en el exón 19 de RFCE seleccionadas de entre el grupo que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1. El kit puede comprender oligonucleótidos tales como sondas o cebadores de amplificación específicos para la secuencia mutada pero para la secuencia de tipo salvaje. Opcionalmente, uno o más cebadores específicos de alelo, cebadores comunes y sondas en el kit pueden seleccionarse de la Tabla 2. El kit comprende además los reactivos necesarios para realizar el ensayo de amplificación y detección, tales como componentes de la PCR, una PCR en tiempo real, o la amplificación mediada por la transcripción (AMT). En algunas realizaciones, el oligonucleótido específico de mutación se encuentra marcado detectablemente. En dichas realizaciones, el kit comprende reactivos para el marcaje y la detección del marcaje. Por ejemplo, en el caso de que el oligonucleótido se marque con biotina, el kit puede comprender un reactivo de estreptavidina con un enzima y su sustrato cromogénico. En variaciones de dicha realización, el kit incluye además reactivos para detectar por lo menos una mutación más en el gen RFCE, seleccionada de entre las siguientes: G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-I759 del T ins, S752-I759 del, P753-K757 del, D770-N771 del NPG ins, D770-N771 del SVD ins, P772-H773 dup, P772-H773 del V ins, M766-A767 del AI ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y y E746-A750 del AP ins.



En todavía otra realización, a exposición es una mezcla de reacción para detectar mutaciones en el gen de RFCE humano, incluyendo una o más mutaciones seleccionadas de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, comprendiendo la mezcla de reacción uno o más oligonucleótidos seleccionados de entre SEC ID nº 11-40.

Se da a conocer además la utilización de oligonucleótidos seleccionados de entre SEC ID nº 11 y nº 40 para detectar una o más mutaciones seleccionadas de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1. Se da a conocer además la utilización de la detección de una o más mutaciones seleccionadas de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, en el diagnóstico o el pronóstico del cáncer.

Se da a conocer además la utilización de la detección de una o más mutaciones seleccionadas de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA, 2239\_2240 TT>CC y 2264 C>A en SEC ID nº 1, en el diseño del tratamiento de un paciente de cáncer o en la predicción de la respuesta del paciente de cáncer al tratamiento.

Ejemplo 1

Identificación de mutaciones en muestras de pacientes de cáncer de pulmón

Las muestras de tejido se obtuvieron de pacientes de cáncer de pulmón (CPCNP). Las muestras se conservaron como tejido fijado en formalina e incluido en parafina (TFFIP). Se aislaron ácidos nucleicos a partir de las muestras y se sometieron a secuenciación directa en el instrumento Genome Sequencer FLX (454 Life Sciences, Branford, Conn.).

La mutación 2236\_2248>ACCC se detectó en una media de 24,6% del total de 3.550 lecturas de una muestra. La mutación 2237\_2244>CGCCC se detectó en una media de 27,7% del total de 4.205 lecturas de una muestra. La mutación 2252\_2277>AC se detectó en una media de 24,6% del total de 5.368 lecturas de una muestra. La mutación 2240\_2264>CGAAAGA se detectó en una media de 32,2% del total de 3.394 lecturas de una muestra. La mutación 2239\_2240 TT>CC se detectó en una media de 74,3% del total de 3.120 lecturas de una muestra. La mutación 2264 C>A se detectó en una media de 32,8% del total de 3.394 lecturas de una muestra. Se encontró que sólo una fracción de las lecturas contenía una mutación, reflejando el hecho de que las muestras son mezclas de células tumorales y células no tumorales.

Ejemplo 2

Detección de mutaciones utilizando oligonucleótidos específicos de alelo

En el presente ejemplo, las dianas mutante y de tipo salvaje se representaron mediante plásmidos que contenían las inserciones mutante y de tipo salvaje, respectivamente. Se amplificaron las dianas utilizando cebadores específicos de mutación o, en reacciones de control, cebadores "comunes" no selectivos.

Cada 15 µl de reacción contenían 10.000 copias del ADN diana y reactivos de PCR estándar, incluyendo nucleósidos trifosfato, ADN polimerasa, uracil-N-glucosilasa y 0,1 mM de cada uno de los cebadores directo e inverso y 0,05 mM de sonda (todos seleccionados de la Tabla 2). La amplificación y el análisis se llevaron a cabo utilizando el instrumento LightCycler™ 480 (Roche Applied Science, Indianapolis, Ind.). Las reacciones se ciclaron utilizando el perfil siguiente: 50°C durante minutos, seguido de 2 ciclos de 95°C durante 10 segundos y 62°C durante 30 segundos, seguido de 55 ciclos de 93°C durante 10 seguidos y 62°C durante 30 segundos.

Los resultados para cada cebador directo se muestran en la Tabla 3. La amplificación se representa por el valor "ciclos hasta el umbral" o  $C_t$ . El valor más alto de  $C_t$  representa una amplificación menos eficiente, por ejemplo por un cebador desapareado.  $\Delta C_t$  representa la diferencia entre la amplificación de la diana de tipo salvaje y la amplificación de la diana mutante. La presencia de  $\Delta C_t$  indica que se ha detectado la mutación y el valor de  $\Delta C_t$  representa la selectividad del ensayo.

Tabla 3

Detección de mutaciones mediante PCR específica de alelo			
CEBADOR DIR. SEC ID nº	mut $C_t$ *	wt $C_t$	$\Delta C_t$
Mutación 2240_2264>CGAAAGA			
11	22,2	22,6	0,4
12	22,3	30,1	7,8
13	22,5	36,7	14,2
14	21,9	33,1	11,3
15	22,5	22,5	0 (control)

ES 2 564 674 T3

Mutación 2252_2277>AC			
16	22,1	22,5	0,4 (control)
17	22,2	22,6	0,4 (control)
18	24,5	39,4	14,9
19	22,3	27,7	5,4
20	22,6	29,5	6,9
21	21,2	22,3	1,1 (control)
Mutación 2236_2248>ACCC			
22	22,8	23,0	0,2 (control)
23	22,6	29,8	7,2
24	22,5	47,4	24,9
25	22,7	NA	>32,3
26	22,4	22,4	0 (control)
Mutación 2237_2244>CGCCC			
27	23,1	22,9	-0,2 (control)
28	22,7	28,4	5,6
29	22,6	NA	>32,4
30	22,4	NA	>32,6
31	22,8	23,0	0,2 (control)
Mutación 2264C>A			
32	23,1	23,0	-0,1 (control)
33	23,5	39,0	15,5
34	24,7	NA	>30,3
35	24,8	36,5	11,7
Mutación 2239_2240 TT>CC			
36	22,2	22,8	0,6 (control)
37	22,5	25,3	2,8
38	22,4	38,0	15,5
* cada C <sub>t</sub> es una media de dos experimentos NA: no amplificado Control - cebador directo común, no específico de alelo			

5 Aunque la invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a ejemplos específicos, resultará evidente para el experto en la materia que pueden llevarse a cabo diversas modificaciones dentro del alcance de la presente invención. De esta manera, el alcance de la invención no debería considerarse limitado a los ejemplos indicados en la presente memoria, sino a las reivindicaciones proporcionadas posteriormente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de un oligonucleótido específico de mutación para la detección de una o más mutaciones en el gen del factor de crecimiento humano (RFCE) humano, hibridando específicamente dicho oligonucleótido con una mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA y 2264 C>A en SEC ID nº 1.
- 10 2. Utilización del oligonucleótido según la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido se selecciona de entre SEC ID nº nº 12 a nº -14, nº 17 a nº 20, nº 23 a nº 25, nº 28 a nº 30, y nº 33 a nº 35.
- 15 3. Método de detección de una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE) en una muestra de un ser humano, que comprende:  
 (a) poner en contacto el ácido nucleico en la muestra con un oligonucleótido específico de mutación capaz de hibridarse selectivamente con una mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA y 2264 C>A en SEC ID nº 1,  
 (b) incubar la muestra bajo condiciones que permitan la hibridación selectiva del oligonucleótido con el ácido nucleico diana, y  
 (c) detectar la hibridación.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, que comprende además después de la etapa (b), la amplificación del ácido nucleico diana, en el que la hibridación en la etapa (b) resulta en la extensión del oligonucleótido selectivamente hibridable.
- 25 5. Método según la reivindicación 3 o 4, en el que la detección en la etapa (c) tiene lugar durante cada ronda de amplificación.
- 30 6. Método según la reivindicación 3 o 4, en el que la detección en la etapa (c) tiene lugar después del último ciclo de amplificación.
- 35 7. Método según la reivindicación 3, en el que el oligonucleótido se selecciona de entre SEC ID nº nº 12 a nº -14, nº 17 a nº 20, nº 23 a nº 25, nº 28 a nº 30, y nº 33 a nº 35.
- 40 8. Kit para detectar mutaciones en el gen de RFCE humano, incluyendo cualquier mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA y 2264 C>A en SEC ID nº 1, comprendiendo el kit uno o más oligonucleótidos seleccionados de entre SEC ID nº 12 a nº 14, nº 17 a nº 20, nº 23 a nº 25, nº 28 a nº 30 y nº 33 a nº 35, y que además comprende opcionalmente precursores de ácidos nucleicos, polimerasa de ácidos nucleicos, y los reactivos y soluciones necesarios para respaldar la actividad de la polimerasa de ácidos nucleicos.
- 45 9. Mezcla de reacción para detectar mutaciones en el gen de RFCE humano, incluyendo cualquier mutación seleccionada de entre la lista que consiste de 2236\_2248>ACCC, 2237\_2244>CGCCC, 2252\_2277>AC, 2240\_2264>CGAAAGA y 2264 C>A en SEC ID nº 1, comprendiendo la mezcla de reacción uno o más oligonucleótidos seleccionados de entre SEC ID nº 12 a nº 14, nº 17 a nº 20, nº 23 a nº 25, nº 28 a nº 30 y nº 33 a nº 35, y que además comprende opcionalmente precursores de ácidos nucleicos, polimerasa de ácidos nucleicos, y los reactivos y soluciones necesarios para respaldar la actividad de la polimerasa de ácidos nucleicos.

**FIGURA 1A**

1 ATGCGACCCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCTGCCCG  
 61 GCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCAOCGAG  
 121 TTGGGCACITTTGAAGATCATTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTGAGGTG  
 181 GTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCTTAAAG  
 241 ACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAATTCCT  
 301 TTGGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTAATAAGAAAATTCCTATGCCTTAGCA  
 361 GTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAACCCGGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAAATTTA  
 421 CAGGAAATCCTGCATGGCCCGTGGCGTTTCAGCAACAACCCCTGCCCTGTGCAACCTGGAG  
 481 AGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTCGATGGACTTC  
 541 CAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGCTGCTGG  
 601 GGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAAATCATCTGTGCCAGCAGTGTCTCC  
 661 GGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCCAGTACTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCAGGCTGC  
 721 ACAGGCCCCCGGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCGAGACGAAGCCACGTGC  
 781 AAGGACACCTGCCCCCACTCATGCTCTACAACCCCAACAGTACCAGATGGATGTGAAC  
 841 CCGGAGGGCAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCGTAATTTATGTG  
 901 GTGACAGATCACGGCTCGTGCCTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGGAGGAA  
 961 GACGGCGTCCGCAAGTGAAGAAGTGCGAAGGGCCTTGGCCCAAAGTGTGTAACGGAATA  
 1021 GGIATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAA  
 1081 AACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCC  
 1141 TTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAA  
 1201 ATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTT  
 1261 GAGAACCCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTC  
 1321 GTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGTGAGGAT  
 1381 GTGATAATTTACAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAACTG  
 1441 TTTGGGACCTCCGGTCAGAAAAACAAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAG  
 1501 GCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCC  
 1561 AGGGACTGCGTCTTTCGCCGAATGTGAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAAC

**FIGURA 1B**

1621 CTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCA  
 1681 GAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACGTATC  
 1741 CAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATG  
 1801 GGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGC  
 1861 CATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGG  
 1921 CCTAAGATCCCCGCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTG  
 1981 GCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTTCCGAAGCGCACGCTGCGG  
 2041 AGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAAC  
 2101 CAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAACTGAATPCAAAAAGATCAAAGTGCTGGGCTCC  
 2161 GGTGCGTTCCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAAATT  
 2221 CCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAATCCTC  
 2281 GATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCCGCTGCTGGGCATC  
 2341 TGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGAC  
 2401 TATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAG  
 2461 ATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTGGCAGCC  
 2521 AGGAACGTACTGGTGA AAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAA  
 2581 CTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATCAAGTGG  
 2641 ATGGCATTGGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGATGTCTGGAGCTAC  
 2701 GGGGTGACTGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGAATCCCTGCC  
 2761 AGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAACGCCTCCCTCAGCCACCCATATGTACC  
 2821 ATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGTGGATGATAGAOCGAGATAGTCGCCCCAAG  
 2881 TTCCGTGAGTTGATCATCGAATTCTCCAAAATGGCCCCGAGACCCCCAGCGCTACCTTGTC  
 2941 ATTCAGGGGGATGAAAAGAATGCATTTGCCAAGTCTACAGACTCCAACCTTCTACCGTGCC  
 3001 CTGATGGATGAAGAAGACATGGACGACGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATCCCACAG  
 3061 CAGGGCTTCTTCAGCAGCCCCCTCCACGTACGGACTCCCCCTCCTGAGCTCTCTGAGTGCA  
 3121 ACCAGCAACAATTCCACCGTGGCTTGCATTGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGTCCCATC  
 3181 AAGGAAGACAGCTTCTTGCAGCGATACAGCTCAGACCCCCACAGGCGCCTTGACTGAGGAC

**FIGURA 1C**

3241 AGCATAGACGACACCTTCCTCCCAGTGCCTGAATACATAAAACCAGTCCGTTCCCAAAGG  
3301 CCOGCTGGCTCTGTGCAGAATCCTGTCTATCACAATCAGCCTCTGAACCCCGCGCCAGC  
3361 AGAGACCCACACTACCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTATCTCAAC  
3421 ACTGTCCAGCCCACCTGTGTCAACAGCACATTCGACAGCCCTGCCCACTGGGCCAGAAA  
3481 GGCAGCCACCAAATTAGCCTGGACAACCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCAAGGAA  
3541 GCCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTAAGGGTC  
3601 GCGCCACAAAGCAGTGAATTTATTGGAGCATGA

(SEC ID n° 1)

## FIGURA 2

1 MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRALEBEKV CQGTSNKLTQ LGTFEDHFLS  
 51 LQRMFNCEV VLGNLEITYV QRNYDLSFLK TIQEVAGYVL IALNTVERIP  
 101 LENLQIIRGN MYYENSYALA VLSNYDANKT GLKELPMRNL QEILHGAVRF  
 151 SNNPALCNVE SIQWRDIVSS DFSLNMSMDF QNHLGSCQKC DPSCPNGSCW  
 201 GAGEENCQKL TKIICAQCS GRCRGKSPSD CCHNQCAAGC TGPRESDECLV  
 251 CRKFRDEATC KDTCPPLMLY NPTTYQMDVN PEGKYSFGAT CVKKCPRNYV  
 301 VTDHGSCVRA CGADSYEMEE DGVRKCKKCE GPCRKVCNGI GIGEFKDSLS  
 351 INATNIKHFK NCTSISGDH ILPVAFRGDS FTHTPPLDPQ ELDILKTVKE  
 401 ITGFLLIQAW PENRTDLHAF ENLEIIRGRT KOHGQFSLAV VSLNITSLGL  
 451 RSLKEISDGD VIISGNKNLC YANTINWKKL FGTSQKTKI ISNRGENSCK  
 501 ATGQVCHALC SPEGCWGPEP RDCVSCRNVS RGRECVDKCN LLEGEPPRFV  
 551 ENSECIQCHP ECLPQAMNIT CTGRGPDNCI QCAHYIDGPH CVKTCFAGVM  
 601 GENNTLVWKY ADAGHVCHLC HPNCTYGCTG PGLEGCPING PKIPIATGM  
 651 VGALLLLLVV ALGIGLFMRR RHIVRKRTL RLLQERELVE PLTPSGEAPN  
 701 QALLRILKET EFKKIKVLGS GAFGTIVYKGL WIPEGEKVKI PVAIKELREA  
 751 TSPKANKEIL DEAYVMASVD NPHVCRLGI CLTSTVQLIT QLMPPGCLLD  
 801 YVREHKDNIG SQYLLNWCVQ IAKGMNYLED RRLVHRDLAA RNVLVKTPQH  
 851 VKITDFGLAK LLGABEKEYH AEGGKVPIKW MALESILHRI YTHQSDVWSY  
 901 GVTVWELMTF GSKPYDGIPA SEISSILEKG ERLPQPPICT IDVYMIMVKC  
 951 WMIDADSRPK FRELIIEFSK MARDPQRYLV IQGDERMHL P SPTDSNFYRA  
 1001 LMDEEDMDDV VDAEYLIPQ QGFFSSPSTS RTPLLSSLSA TSNNSTVACI  
 1051 DRNGLQSCPI KEDSFLQRY S DPTGALTED SIDDTFLPVP EYINQSVPKR  
 1101 PAGSVQNPVY HNQPLNPAPS RDPHYQDPHS TAVGNPEYLN TVQPTCVNST  
 1151 FDSPAHWAK GSHQISLDNP DYQQDFPKE AKPNGIFKGS TAENAEYLRV  
 1201 APQSSEFIGA

**FIGURA 3**

2221 CCGTGGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGA 2260 (SEC ID n° 3)  
 -> CCGTGGCTATCAAG-----ACCCCAACATCTCCGA (SEC ID n° 4)

**FIGURA 4**

2221 CCGTGGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGA 2260 (SEC ID n° 3)  
 -> CCGTGGCTATCAAG---CGCCCGAAGCAACATCTCCGA (SEC ID n° 5)

**FIGURA 5**

2221 CCGTGGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCCAAGGAATCCTC 2280 (SEC ID n° 6)  
 -> CCGTGGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAA-----ACCTC (SEC ID n° 7)



FIGURA 6

2221 CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAAATCCTC 2280 (SEC ID n° 6)  
 -> CCGTCGCTATCAAGGAAT-----CGAAAGACAACAAGGAAATCCTC (SEC ID n° 8)

FIGURA 7

2221 CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGA 2260 (SEC ID n° 3)  
 -> CCGTCGCTATCAAGGAACCAAGAGAAGCAACATCTCCGA (SEC ID n° 9)

FIGURA 8

2221 CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAAATCCTC 2280 (SEC ID n° 6)  
 -> CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGACAACAAGGAAATCCTC (SEC ID n° 10)