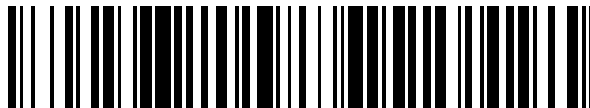


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 410**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2006 E 06720702 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 1851339**

54 Título: **Procedimientos y composiciones de detección de un mutante de EGFR resistente a fármacos**

30 Prioridad:

11.02.2005 US 652488 P

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

14.10.2016

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER
CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10021, US**

72 Inventor/es:

**VARMUS, HAROLD;
POLITI, KATERINA;
PAO, WILLIAM y
MILLER, VINCENT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 586 410 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

Procedimientos y composiciones de detección de un mutante de EGFR resistente a fármacos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la detección de una resistencia adquirida a los efectos terapéuticos de gefitinib o erlotinib en un sujeto que padece o del que se sospecha que tiene cáncer de pulmón, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra del sujeto, y
- b) sondar la muestra con un medio para detectar de forma selectiva una secuencia de nucleótidos que comprende una T mutante en la posición correspondiente a la base 2369 del ADNc del EGFR (SEQ ID NO: 1);
- 10 c) identificar que la base en dicha posición es T;

en el que encontrar que la forma mutante está presente indica que el cáncer está desarrollando resistencia adquirida a los efectos terapéuticos de gefitinib o erlotinib, en el que el paciente se ha tratado con gefitinib o erlotinib antes de que la muestra se haya obtenido del paciente, y el paciente era sensible a gefitinib o erlotinib cuando se administró por primera vez.

15 Antecedentes de la invención

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se ha identificado como una diana importante para el tratamiento de los tumores sólidos, dado que está implicado en la regulación de funciones celulares importantes en la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. El EGFR se expresa normalmente en una serie de tumores, y la alta expresión está relacionada con frecuencia a un mal pronóstico. Ha aparecido una nueva clase de terapias selectivas dirigidas a inhibir el EGFR, los inhibidores de la tirosina quinasa. Dos ejemplos conocidos son gefitinib (Iressa) o erlotinib (Tarceva). A pesar de las respuestas iniciales de algunos pacientes a estas terapias, los pacientes eventualmente evolucionan mediante mecanismos desconocidos de resistencia "adquirida".

Se ha pensado que el EGFR desempeña una función importante en el cáncer de pulmón. Sin embargo, solo una pequeña parte de los cánceres de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) responde a Iressa o Tarceva (véanse las estructuras en la Figura 1). Los adenocarcinomas de pulmón de pacientes que responden a los inhibidores de la tirosina quinasa gefitinib o erlotinib habitualmente llevan mutaciones somáticas de ganancia de función en exones que codifican el dominio tirosina quinasa del EGFR. Tales mutaciones se encuentran en aproximadamente el 10% de los CPCNP de los Estados Unidos [1,2,3], observándose mayores incidencias en Asia del este [2,4,5,6]. Alrededor del 90% de las mutaciones asociadas con el CPCNP se producen como delecciones dentro del marco de lectura de múltiples nucleótidos en el exón 19, que implican la eliminación de cuatro aminoácidos, Leu-Arg-Glu-Ala, o como una única sustitución nucleotídica en el nucleótido 2573 (T→G) en el exón 21, que da como resultado la sustitución de leucina por arginina en la posición 858 (L858R). Estas dos mutaciones están asociadas con la sensibilidad a los inhibidores de quinasa de molécula pequeña gefitinib o erlotinib [1,2,3]. Estas y otras mutaciones también se describen en [29]. Desafortunadamente, en casi todos los pacientes que experimentan una mejoría clara con estos fármacos finalmente se desarrolla la evolución de la enfermedad. Aunque las mutaciones de KRAS (v-Ki-ras2, homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten, un miembro de la familia RAS) se han asociado con algunos casos de resistencia primaria a gefitinib o erlotinib [7], se desconocen los mecanismos que subyacen a la resistencia "adquirida" o "secundaria".

40 Por lo tanto, en la técnica existe la necesidad de determinar las causas subyacentes de tal resistencia de forma que se pueda desarrollar una prueba diagnóstica y proporcionar un tratamiento más eficaz. Además, en la técnica existe la necesidad de nuevos compuestos que sean capaces de tratar pacientes que muestran evolución del cáncer o recaída a pesar de la respuesta inicial a los actuales inhibidores del EGFR.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para la detección de una resistencia adquirida a los efectos terapéuticos de gefitinib o erlotinib en un sujeto que padece o se sospecha que tiene cáncer de pulmón, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra del sujeto, y
- b) sondar la muestra con un medio para detectar de forma selectiva una secuencia de nucleótidos que comprende una T mutante en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR (SEQ ID NO: 1);
- 50 c) identificar que la base en dicha posición es T;

en el que encontrar que la forma mutante está presente indica que el cáncer está desarrollando resistencia adquirida a los efectos terapéuticos de gefitinib o erlotinib, en el que el paciente se ha tratado con gefitinib o erlotinib antes de que se haya obtenido la muestra del paciente y el paciente era sensible a gefitinib o erlotinib cuando se administró la primera vez. Los presentes inventores también describen cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa dirigidos a la detección del mutante de EGFR C~>T en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR. Esta mutación codifica un cambio en la proteína EGFR de treonina en el tipo silvestre a metionina en el

mutante en la posición 790. Se ha demostrado que esta mutación es escasa en los pacientes antes o en las fases tempranas del tratamiento con gefitinib o erlotinib. Pero como la mutación anula la sensibilidad a estos agentes, las células cancerosas que portan la mutación se seleccionan de forma positiva, conduciendo a pacientes que son resistentes al tratamiento adicional. La invención proporciona adicionalmente procedimientos para detectar la mutación en los pacientes, cuyo objetivo final es la identificación precoz de los casos de resistencia de manera que se puedan iniciar tratamientos alternativos.

Los presentes inventores también describen un cebador de PCR que hibrida en condiciones de PCR adecuadas con una cadena con sentido o con una cadena antisentido de una secuencia de polinucleótido 5' en cada cadena respectiva para una mutación de un gen del EGFR que codifica una sustitución de treonina por metionina en la posición 790 del polipéptido EGFR, en el que el cebador de PCR se une a una distancia menor de 200 nucleótidos de dicha mutación. Las estructuras generales del cebador se proporcionan basándose en las SEQ ID NO: 4-7 y 12-15, que pueden ser más grandes o más pequeñas que estas secuencias particulares, así como cebadores cuyas secuencias pueden tener un determinado número de bases en las secuencias proporcionadas en las SEQ ID NO: 4-7 y 12-15 que están sustituidas por otras bases.

Los presentes inventores también describen un cebador de PCR que hibrida en condiciones de PCR adecuadas con un primer polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR de tipo silvestre, o un fragmento de polinucleótido del mismo, en el que el cebador hibrida con la secuencia de la cadena con sentido o con la secuencia de la cadena antisentido que incluye la C de tipo silvestre en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR y en el que el cebador hibrida de forma débil o no hibrida en absoluto con un segundo polinucleótido EGFR que contiene una T mutante en la posición 2369 en las condiciones de PCR.

Los presentes inventores también describen un cebador de PCR que hibrida en condiciones de PCR adecuadas con un primer polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR mutante, o un fragmento de polinucleótido del mismo, en el que el cebador hibrida con la secuencia de la cadena con sentido o con la secuencia de la cadena antisentido que incluye una T mutante en la posición correspondiente a la base 2369 del ADNc de EGFR y en el que el cebador hibrida de forma débil o no lo hace en absoluto con un segundo polinucleótido EGFR que contiene una C de tipo silvestre en la posición 2369 en las condiciones de PCR. Las estructuras generales del cebador se proporcionan basándose en la SEQ ID NO: 12 y 13, que pueden ser más grandes o más pequeñas que estas secuencias particulares, así como en los cebadores cuyas secuencias pueden tener un determinado número de bases en las secuencias proporcionadas en las SEQ ID NO: 12 y 13 que están sustituidas por otras bases.

Los presentes inventores también describieron un procedimiento para la detección de un gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutante en una muestra que incluye sondear la muestra con un medio para detectar de forma selectiva una secuencia de nucleótidos que contiene una T mutante en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR e identificar que la base en dicha posición es T. En una realización significativa, el medio distingue entre la detección de una T mutante y una C de tipo silvestre.

En realizaciones comunes, la muestra incluye tejido o células que son o se sospecha que son cancerosas o malignas. Tales muestras se originan en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer o tumor maligno, y se pueden obtener mediante biopsia o procedimientos quirúrgicos similares.

En determinadas realizaciones prevalentes de este procedimiento, el sondeo incluye las etapas de

- a) si es necesario, tratar la muestra para liberar los ácidos nucleicos contenidos en ella;
- b) poner en contacto los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra con una composición que incluye un primer cebador de PCR que hibrida con la secuencia de la cadena con sentido o con la secuencia de la cadena antisentido que incluye la T mutante en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR y en el que el cebador hibrida de forma débil o no lo hace en absoluto con un segundo polinucleótido del EGFR que contiene una C de tipo silvestre en la posición 2369 en las condiciones de PCR; y
- c) llevar a cabo una reacción de PCR en presencia de un segundo cebador de PCR para proporcionar un amplicón de PCR que contiene una T mutante en la posición que corresponde a la base 2369.

La reacción de PCR puede incorporar de forma ventajosa un marcador en el amplicón de PCR; esto permite la etapa de identificación para incluir la detección del marcador.

En realizaciones frecuentes alternativas de este procedimiento, el sondeo incluye las etapas de

- a) si es necesario, tratar la muestra para liberar los ácidos nucleicos contenidos en ella;
- b) poner en contacto los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra con una composición que incluye un par de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que hibridan en condiciones de PCR adecuadas con un polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR, en el que el par de cebadores engloba la posición correspondiente a la base 2369 del ADNc del EGFR, para proporcionar una mezcla de PCR;
- c) llevar a cabo una reacción de PCR en la mezcla para proporcionar un amplicón de PCR que contiene la posición correspondiente a la base 2369; y
- d) poner en contacto el amplicón con un medio de escisión que escinde al amplicón ya sea

- 5 i) escindiendo un amplicón que tenga una T mutante en la posición que corresponde a la base 2369 a una distancia menor de 6 bases desde la posición, pero sin escindir un amplicón que tenga una C de tipo silvestre en la posición, o
 ii) escindiendo un amplicón que tenga una C de tipo silvestre en la posición que corresponde a la base 2369 a una distancia menor de 6 bases desde la posición, pero sin escindir un amplicón que tenga una T mutante en la posición.

La reacción de PCR puede incorporar de forma ventajosa un marcador en el amplicón de PCR que permita así la identificación, para incluir la detección de polimorfismos de longitud de los polinucleótidos marcados escindidos.

En otras realizaciones comunes adicionales de este procedimiento, el sondeo incluye las etapas de

- 10 a) si es necesario, tratar la muestra para liberar los ácidos nucleicos contenidos en ella;
 b) inmovilizar por lo menos una parte de los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra sobre un soporte sólido; y
 c) poner en contacto los ácidos nucleicos inmovilizados con un oligonucleótido sonda que hibrida con un polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR, en el que la secuencia de la sonda incluye una base complementaria a una T mutante en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR y en el que
 15 la sonda hibrida de forma débil o no lo hace en absoluto con un polinucleótido que contiene una C de tipo silvestre en la posición 2369 en condiciones de hibridación adecuadas.

En una realización común de un procedimiento inverso al que se acaba de describir, el sondeo incluye las etapas de

- 20 a) si es necesario, tratar la muestra para liberar los ácidos nucleicos contenidos en ella;
 b) inmovilizar un oligonucleótido sonda que hibrida con un polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR en el que la secuencia de la sonda incluye una base complementaria a una T mutante en la posición que corresponde con la base 2369 del ADNc del EGFR y en el que la sonda hibrida de forma débil o no lo hace en absoluto con un polinucleótido que contiene una C de tipo silvestre en la posición 2369 sobre un soporte sólido; y
 c) poner en contacto la sonda inmovilizada con por lo menos una parte de los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra en condiciones adecuadas de hibridación.

- 25 En estas realizaciones que implican un soporte sólido, el componente que se une a los compañeros inmovilizados incluye un marcador y la identificación incluye la detección del marcador.

30 Los presentes inventores también describen un procedimiento para predecir la resistencia a los efectos terapéuticos de gefitinib o erlotinib en un sujeto que padece o se sospecha que tiene un cáncer. Este procedimiento emplea las etapas descritas en el procedimiento de detección de un gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutante en una muestra, descrito en los párrafos precedentes, y concluye que después de un hallazgo positivo de un mutante en la posición 2369, se predice que el sujeto es resistente al tratamiento con gefitinib o erlotinib.

35 Los presentes inventores también describen un kit que incluye por lo menos un envase y, contenida en el, una composición que incluye por lo menos un cebador de PCR descrito en los párrafos precedentes. En determinadas realizaciones, el kit incluye adicionalmente un medio de escisión que escinde un polinucleótido de EGFR ya sea

- 40 a) escindiendo un polinucleótido que tiene una T mutante en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR a una distancia menor de 6 bases desde la posición, pero sin escindir un polinucleótido que tenga una C de tipo silvestre en la posición, o
 b) escindiendo un polinucleótido que tenga una C de tipo silvestre en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR a una distancia menor de 6 bases desde la posición, pero sin escindir un polinucleótido que tenga una T mutante en la posición.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Estructuras químicas de gefitinib y erlotinib.

45 Figura 2. Representación esquemática de diversas realizaciones de los polinucleótidos de la invención. La longitud es de 200 nucleótidos o menor, o de 11 nucleótidos o mayor. En c) las barras verticales más oscuras representan de forma esquemática nucleótidos sustituidos.

Figura 3. Un ensayo de PCR-RFLP Nuevo Confirma de Forma Independiente la Presencia de la Mutación T790M en el Exón 20 del Dominio Quinasa del EGFR

- 50 (A) Diseño del ensayo (véanse los detalles en el texto). "F" indica un marcador fluorescente, tal como FAM. En la parte inferior de este panel, el ensayo demuestra, con el producto de escisión con NlaIII de 97 pb, la presencia de la mutación T790M en la línea celular H1975; este producto está ausente en el ADN H2030. El producto de escisión NlaIH de 106 pb se genera mediante la digestión del EGFR de tipo silvestre.
 (B) El ensayo de PCR-RFLP demuestra que las muestras de tumor antes del tratamiento con el fármaco de tres pacientes carecen de niveles detectables del producto de 97 pb mutante, aunque las muestras de ensayo

obtenidas después de la evolución de la enfermedad contienen la mutación T790M. Pt: paciente.

Figura 4. Estudios de formación de imágenes de los pacientes 1, 2 y 3

- (A) Paciente 1. Radiografías de tórax en serie de antes (día 0) y durante el tratamiento con gefitinib (14 d y 9 meses), que demuestran la respuesta inicial y la progresión posterior.
- (B) Paciente 2. Estudios en serie de TC de tórax antes (día 0) y durante el tratamiento con erlotinib (4 meses y 25 meses), que demuestran la respuesta inicial y la progresión posterior.
- (C) Paciente 3. Radiografías de tórax en serie antes (día 0) y durante el tratamiento adyuvante con gefitinib (3 meses), después de la resección completa de la enfermedad bien visible. El derrame pleural del lado izquierdo visto a los 3 meses reapareció 4 meses más tarde, momento en el que se recogió líquido para el análisis molecular.

Figura 5. Estudios de Re-Biopsia. Las agujas de biopsia se indican con flechas blancas.

- (A) Paciente 1. Biopsia guiada por TC de lesiones pulmonares en aumento 10 meses después de gefitinib (panel izquierdo). Dos meses después, se recogió líquido de un derrame pleural del lado derecho (panel derecho) para el análisis molecular.
- (B) Paciente 2. Biopsia guiada por TC de una lesión en la columna vertebral dorsal (panel izquierdo) y biopsia guiada por fluoroscopia de una lesión pulmonar en aumento (panel derecho).

Figura 6. Cromatogramas de secuenciación con las mutaciones de los exones 19 y 21 del EGFR identificadas en los pacientes 1 y 2

- (A) Estado del exón 21 del EGFR en muestras de ensayo tumorales del paciente 1. El ADN de la lesión pulmonar en aumento y del derrame pleural demostró una mutación T-^AG heterocigota en la posición 2573, que conduce a la sustitución de aminoácidos común L858R.
- (B) Las tres muestras de ensayo del paciente 2 mostraron la misma delección del exón 19 heterocigota, que elimina los restos 747-749 y cambia la alanina en la posición 750 por prolina. Las señales originales de secuenciación en cuatro colores se han transformado en blanco y negro.

Figura 7. Cromatogramas de secuenciación con la mutación del exón 20 del EGFR T790M en diversas muestras de ensayo clínicas y en la línea celular de CPCNP HI 975. Las señales de secuenciación originales en cuatro colores se han transformado en blanco y negro.

- (A-C) En los tres pacientes - paciente 1 (A), paciente 2 (B) y paciente 3 (C) - la mutación secundaria T790M se observó solo en lesiones obtenidas después de la evolución, ya sea con gefitinib o erlotinib.
- (D) La línea celular H1975 contiene tanto una mutación L858R del exón 21 (panel superior) como la mutación T790M del exón 20 (panel inferior). Los asteriscos indican un polimorfismo mononucleotídico (PMN) común (A o G), en el nucleótido 2361; las flechas indican la mutación en el nucleótido 2369 (C→T), que conduce a la sustitución de treonina (ACG) por metionina (ATG) en la posición 790. En la dirección directa, el pico de la T mutante es azul. En la dirección inversa, el pico mutante es de verde, mientras que el pico azul subyacente representa un "eco" del nucleótido adyacente.

Figura 8. Los mutantes de EGFR que contienen la mutación T790M son resistentes a la inhibición por Gefitinib o Erlotinib. Se transfectaron células 293 T de forma transitoria con plásmidos que codifican el EGFR de tipo silvestre (TS) o con EGFR mutantes con los siguientes cambios: T790M, L858R, L858R + T790M, del L747-E749; A750P o del L747-E749; A750P + T790M. Después de 36 h, las células se privaron de suero durante 24 h, se trataron con gefitinib o erlotinib durante 1 h y después se recolectaron para el análisis por inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti p-EGFR (Y1 092), anti-t-EGFR, anti-fosfotirosina (p-Tyr) y anti-actina. La mutación T790M del EGFR, junto con el EGFR de tipo silvestre o el mutante L858R del EGFR sensible a fármaco, evita la inhibición de la fosforilación de la tirosina (A) o p-EGFR (B) mediante gefitinib. De forma análoga, la mutación T790M, junto con el mutante de EGFR del L747-E749; A750P sensible a fármaco, evita la inhibición de p-EGFR mediante erlotinib (C).

Figura 9. La sensibilidad a gefitinib difiere entre líneas celulares de CPCNP que contienen diversas mutaciones en el EGFR o KRAS. Las tres líneas celulares de CPCNP indicadas (H3255: mutación L858R; H1975: mutaciones tanto T790M como L858R; y H2030: EGFR de tipo silvestre, KRAS mutante (véase la Tabla 7)) se cultivaron en concentraciones crecientes de gefitinib, y se midió la densidad de las células vivas después de 48 horas de tratamiento utilizando un ensayo de fluorescencia de calceína AM. La fluorescencia en las células tratadas con vehículo se expresa como el 100 %. Los resultados son la media ± TE de tres experimentos independientes en los que hubo de cuatro a ocho repeticiones de cada condición. Se obtuvieron resultados similares con erlotinib.

Figura 10. La sensibilidad a erlotinib difiere entre las líneas celulares de CPCNP que contienen diversas mutaciones en el EGFR o KRAS. Véase la leyenda de la Figura 9.

Descripción detallada de la invención

5 Abreviaturas: LMC, leucemia mielógena crónica; TC, tomografía computarizada; del, deleción; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; GIST, tumor del estroma gastrointestinal; SHE, síndrome hipereosinófilico; CPCNP, cáncer de pulmón de células no pequeñas; p-EGFR, fosfo-EGFR; PCR-RFLP, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR; PMN, polimorfismo mononucleotídico; t-EGFR, EGFR total.

Números de Referencia: la secuencia del EGFR de referencia se obtuvo del número de referencia de LocusLink 1956 y del número de acceso del GenBank NT_033968.

10 Se utilizaron dos sistemas de numeración para el EGFR. El primero indica la metionina de inicio en la secuencia señal como el aminoácido -24. El segundo, utilizado en el presente documento, indica la metionina como el aminoácido +1. Los proveedores comerciales de anticuerpos, tales como el Y1068 específico anti-fosfo-EGFR, utiliza la primera nomenclatura. Para ser uniformes, Los presentes inventores consideran a YI 068 como YI 092. Así mismo, la mutación T790M comunicada en el presente documento también se ha denominado T766M.

En la presente descripción, los artículos “un”, “una” y “el/la” se refieren de forma equivalente a un significado tanto singular como plural. El sentido particular de estos artículos es evidente a partir del contexto en los que se utilizan.

15 Como se usa en el presente documento, el término “tumor” se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásicos, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

20 Como se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a células o tejidos que poseen características tales como proliferación incontrolada, pérdida de funciones especializadas, inmortalidad, potencial metastásico significativo, aumento significativo de actividad anti-apoptótica, velocidad de crecimiento y proliferación rápida y determinadas características morfológicas y marcadores celulares. En algunas circunstancias, las células cancerosas estarán en la forma de un tumor; tales células pueden existir de forma local en un animal y, en otras circunstancias, pueden circular en el torrente sanguíneo como células independientes, por ejemplo, células leucémicas.

25 Para determinar si los cánceres que adquieren resistencia clínica ya sea a gefitinib o erlotinib presentan mutaciones adicionales en el dominio quinasa del EGFR, los presentes inventores examinaron el estado de los exones 18 a 24 del EGFR en los tumores de trece pacientes que respondieron de forma inicial, pero en los que posteriormente evolucionó la enfermedad mientras estaban con estos fármacos. Estos exones también se evaluaron en células tumorales procedentes de un decimocuarto paciente cuya enfermedad reapareció rápidamente mientras estaba en terapia con gefitinib después de la resección completa del grueso del tumor. Debido a la asociación de las mutaciones de KRAS con la resistencia primaria a gefitinib y erlotinib [7], los presentes inventores también analizaron el estado de KRAS en células tumorales procedentes de estos seis pacientes. En un esfuerzo para explicar la ventaja selectiva de las células con una mutación “de resistencia” recién identificada en el EGFR-- una sustitución de aminoácidos T790M (también conocida como T766M), un cambio C-^T en 2369 en la secuencia genómica del EGFR - los presentes inventores caracterizaron adicionalmente la sensibilidad a fármacos de mutantes del EGFR supuestamente resistentes frente al tipo silvestre o a mutantes del EGFR sensibles a fármacos, utilizando una línea celular de CPCNP que se encontró de forma fortuita que contiene la mutación T790M y lisados de células transfectadas de forma transitoria con los ADNc del EGFR de tipo silvestre y mutante.

35 La SEQ ID NO: 1 (mostrada en la Tabla 1) presenta la secuencia del ADNc del gen del EGFR humano mutante. El par de cebadores utilizados para amplificar el fragmento del EGFR utilizado para la secuenciación para detectar la presencia o ausencia de la mutación del EGFR T790M está subrayado y en cursiva. El nucleótido mutante t2369 se muestra en letra negrita agrandada. La secuencia del EGFR de tipo silvestre se conoce a partir del GenBank n.º de referencia X00588 y Ullrich, A. y col. “Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells”, Nature 309 (5967), 418-425 (1984). La secuencia de la proteína mutante traducida se muestra en la SEQ ID NO: 2 (Tabla 2). El mutante M790 se muestra en letra negrita agrandada.

ES 2 586 410 T3

Tabla 1. ADNc DEL EGFR MUTANTE DE 2369 C→T

atgcgaccctccgggacggccggggcagcgctcctggcgctgctggctgcgctctgcccggcgagtcg
ggctctggaggaaaagaaagtttgccaaggcacgagtaacaagctcagcagttgggcacttttgaag
atcattttctcagcctccagaggatgttcaataactgtgaggtggctccttgggaatttggaaattacc
tatgtgcagaggaattatgatctttccttcttaagaccatccaggaggtggctggttatgtcctcat
tgccctcaacacagtgagcggaattcctttggaaaacctgcagatcatcagaggaaatatgtactacg
aaaattcctatgccttagcagtccttatctaactatgatgcaataaaaaccggactgaaggagctgcc
atgagaaatttacaggaaatcctgcatggcgccgtgcggttcagcaacaacctgacctgtgcaacgt
ggagagcatccagtgggcgggacatagtcagcagtgactttctcagcaacatgtcgatggacttcaga
accacctgggcagctgccaaaagtgtgatccaagctgtcccaatgggagctgctggggtgcaggagag
gagaactgccagaaaactgacaaaaatcatctgtgccagcagtgctccgggcgctgccgtggcaagtc
cccagtgactgctgccacaaccagtgctgctgcaggtgcacaggccccgggagagcgactgcctgg
tctgcgcgaaattccgagacgaagccaagtgcaaggcacacctgccccactcatgctctacaacccc
accacgtaccagatggatgtgaaacccgagggcaatacagctttggtgccacctgogtgaagaagtg
tccccgtaattatgtggtgacagatcaaggctogtgcgtccgagcctgtggggccgacagctatgaga
tgagggaagacggcgctccgcaagtgtgaagaagtgcgaagggccttgcgcgcaaagtgtgtaacggaata
ggtattggtgaatttaagactcactctccataaatgctacgaatattaacacttcaaaaactgcac
ctccatcagtggggatctccacatcctgccgggtggcatttaggggtgactccttcaacatactcctc
ctctggatccaaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgcctgattcag
gcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaa
gcaacatggtcagttttctcttcagctogtcagcctgaacataacatccttgggattacgctcctca
aggagataagtgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaatacaataaac
tggaaaaaactgtttgggacctccggctcagaaaaacaaaaattataagcaacagaggtgaaaacagctg
caaggccacaggccaggctgcccattgccttgtgctccccgagggctgctggggccccggagcccaggg
actgctctcttgcgggaatgtcagccgagggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggaggg
gagccaagggagtttgtggagaactctgagtgcatcacagtgccacccagagtgccctgctcaggccat
gaacatcacctgcacaggacggggaccagacaaactgtatccagtggtgccactacattgacggcccc
actgctcaagacctgccggcaggagtcagggagaaaacaacacctggctctggaagtaacgcagac
gcccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcccaggctctgaagg
ctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtggggccctcctcttgcctgc
tgggtgggcccctggggatcggcctcttcatgcgaaggccacatcgttcggaagcgcacgctgogg
aggctgctgcaggagagggagcttgtggagcctcttacaccagtgagagaagctccaaccaagctct
cttgaggatcttgaaggaaactgaattcaaaaagatcaaagtgcgtgggctccgggtgcgttcggcacgg
tgtataagggactctggatcccagaaggtgagaaagttaaaattcccgtcgtatcaaggaattaaga
gaagcaacatctccgaaagccacaaggaaatcctcgatgaagcctacgtgatggccagcgtggacaa
ccccacgtgtgcgcctgctgggcattctgctcacctccacctgcagctcatca**t**gcagctcatgc
ccttgggtgctcctcctggactatgtccgggaacacaaagacaatattggctccagctacctgctcaac

tgggtgtgtgcagatcgcaaagggcatgaaactacttggaggaccgtcgcttgggtgcaccgacactggc
 agccaggaacgtactggtgaaaacaccgcagcatgtcaagatcacagattttgggctggccaaactgc
 tgggtgcggaagagaaagaataccatgcagaaggaggcaaagtgcctatcaagtggatggcattggaa
 tcaattttacacagaatctatacccaccagagtgatgtctggagctacggggtgaccgtttgggagtt
 gatgacctttggatccaagccatatacgcggaatccctgcccagcagatctcctccatcctggagaaag
 gagaacgcctccctcagccaccatatagtaccatcgatgtctacatgatcatgggtcaagtgtggatg
 atagacgcagatagtcgcccaggttccgtgagttgatcatcgaattctccaaatggcccagagaccc
ccagcgctaccttgtcattcagggggatgaaagaatgcatttggcaagtccacagactccaacttct
 accgtgccctgatggatgaagaagacatggacgacgtgggtggatgccgacgagtacctcatcccacag
 cagggcttcttcagcagcccctccacgtcacggactcccctcctgagctctctgagtgcaaccagcaa
 caattccaccgtggcttgcattgatagaaatgggctgcaaagctgtcccatcaaggaagacagcttct
 tgcagcgatacagctcagaccccacagggccttgactgaggacagcatagacgacaccttccctcca
 gtgctgaatacataaaccagtcggttcccaaaaggcccgtggctctgtgcagaatcctgtctatca
 caatcagcctctgaaccccgcgcccagcagagacccacactaccaggacccccacagcactgcagtg
 gcaaccccagatctcaacactgtccagcccactgtgtcaacagcacattcgacagccctgccac
 tgggcccagaaaggcagccaccaattagcctggacaacccctgactaccagcaggacttctttcccaa
 ggaagccaagccaatggcatcttaagggcaccacagctgaaaatgcagaatacctaagggtcgcgccacaagcaggaattaitggagcatg
 a (SEQ ID NO: 1)

Tabla 2. MUTANTE DE EGFR T790M

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTLQGFEDHFLSLQBMFNCEWLGNLEITYVQRNYDL
 SFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLIIRGNMYENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNP
 ALCNVEISIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNLHLSGQKCDPSCPNGSCWAGAGEENCQKLTIIICAQQCSGRCRGKS
 PSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNY
 WTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGDLHILPVA
 FRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAWSLNITSLGLRSLK
 EISDGDVVISGNKLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPPEPRDCVSCRNV
 SRGRECVDKCKLLEGEPEFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCVAGVMGEN
 NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCTNGPKIPSIATGMVGLLLLLLWALGIGLFMRRRHIVRKRRL
 RRLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKAN
 KEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLIMQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLED
 RLVHRDLAARNVLVKTQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVPKWMMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWE
 LMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGD
 ERMHLPSPDTSNFYRALMDEEDMDDWDADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPI
 KEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVG
 NPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAAQKGSQISLDNPDYQQDFFPKAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQS (
 SEQ ID NO : 2)

5 Como se utiliza en el presente documento, un “ácido nucleico” o “polinucleótido”, y términos y frases similares, se refieren a los polímeros compuestos de nucleótidos de origen natural, así como a polímeros compuestos de nucleótidos sintéticos o modificados. Por lo tanto, como se utiliza en el presente documento, un polinucleótido que es un ARN, o un polinucleótido que es un ADN, o un polinucleótido que contiene desoxirribonucleótidos y

ribonucleótidos, puede incluir restos de origen natural tales como las bases de origen natural y anillos de ribosa o desoxirribosa, o pueden estar compuestos de restos sintéticos o modificados tales como los descritos a continuación. Un polinucleótido empleado en el presente documento puede ser monocatenario o puede ser una estructura bicatenaria con emparejamiento de bases, o incluso una estructura tricatenaria con emparejamiento de bases.

Los ácidos nucleicos y polinucleótidos pueden ser de 20 o más nucleótidos de longitud, o de 30 o más nucleótidos de longitud, o de 50 o más nucleótidos de longitud, o de 100 o más, o de 1000 o más, o de decenas de miles o más, o de cientos de miles o más, de longitud. Como se utiliza en el presente documento, "oligonucleótidos" y términos similares basados en este se refieren a polímeros cortos compuestos de nucleótidos de origen natural, así como a polímeros compuestos de nucleótidos sintéticos o modificados, como se describe en el párrafo inmediatamente anterior. Los oligonucleótidos pueden ser de 10 o más nucleótidos de longitud, o de 20 o más nucleótidos de longitud, o de 30 o más nucleótidos de longitud, o de 40 o más, hasta aproximadamente 50, nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse de forma química y pueden utilizarse como cebadores de PCR, o sondas, entre otros usos.

Se comprende que, debido al solapamiento en los intervalos de tamaño proporcionados en el párrafo precedente, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se pueden utilizar como sinónimos en el presente documento para referirse a un cebador o una sonda de la invención.

Como se usa en el presente documento, "secuencia de nucleótidos", "secuencia de oligonucleótido" o "secuencia de polinucleótido", y expresiones similares, se refieren indistintamente a la secuencia de bases que tiene un oligonucleótido o polinucleótido, así como a la estructura del oligonucleótido o polinucleótido que posee la secuencia. Una secuencia de nucleótidos o una secuencia de polinucleótido se refiere adicionalmente a cualquier polinucleótido u oligonucleótido natural o sintético en el que la secuencia de bases se define mediante descripción o mención de una secuencia particular de letras que designan bases como se emplean de forma convencional en este campo.

Los trabajadores con habilidad en campos tales como la bioquímica, la biología molecular, la genómica y campos similares relacionados con el campo de la invención entienden de forma convencional que un "nucleósido" comprende un monosacárido unido por enlace glucosídico a una base purínica o pirimidínica; y un "nucleótido" comprende un nucleósido con por lo menos un grupo fosfato agregado, normalmente en una posición 3' o una 5' (en el caso de las pentosas) del sacárido, pero puede estar en otras posiciones del sacárido. Los restos de nucleótidos ocupan posiciones secuenciales en un oligonucleótido o un polinucleótido. Una modificación o derivado de un nucleótido puede aparecer en cualquier posición secuencial en un oligonucleótido o un polinucleótido. Las modificaciones o derivados pueden aparecer en el grupo fosfato, el monosacárido o la base.

Como ejemplos no limitantes, las siguientes descripciones proporcionan determinados nucleótidos modificados o derivatizados, todos los cuales están dentro del ámbito de los polinucleótidos descritos en el presente documento. El monosacárido puede modificarse para ser, por ejemplo, una pentosa o una hexosa que sea una ribosa o desoxirribosa. El monosacárido también puede modificarse sustituyendo grupos hidroxilo con grupos hidro o amino, alquilando o esterificando grupos hidroxilo adicionales, etc. Los sustituyentes en la posición 2', tales como el grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-alilo, 2'-O-aminoalquilo o 2'-desoxi-2'-fluoro proporcionan a un oligonucleótido propiedades de hibridación potenciadas.

Las bases en los oligonucleótidos y polinucleótidos pueden ser bases "no modificadas" o "naturales" que incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Además, pueden ser bases con modificaciones o sustituciones. Los ejemplos no limitantes de bases modificadas incluyen otras bases sintéticas y naturales tales como hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-carboximetil-aminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina, 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo, 5-halocitosina, 5-propil-uracilo, 5-propinil-citosina y otros derivados alquílicos de bases pirimidínicas, 6-azo-uracilo, 6-azo-citosina, 6-azo-timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil-, 8-hidroxil- y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citocinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-fluoro-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las bases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1-pirimido[5,4-b][1,4] benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas de guanina tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las bases modificadas también

pueden incluir aquellas en las que la base purínica o pirimidínica se ha reemplazado por otros heterociclos, por ejemplo 7-desazaadenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras bases adicionales incluyen las desveladas en la patente de Estados Unidos n.º 3.687.808, las desveladas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley y Sons, 1990, las desveladas por English y col., Angewandte Chemie, Edición Internacional (1991) 30, 613, y las desveladas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas bases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos descritos en el presente documento. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones de 5-metilcitosina han mostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 grados C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pág. 276-278) y son actualmente las sustituciones de base preferentes, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo. Véanse las Patentes de Estados Unidos 6.503.754 y 6.506.735 y las referencias citadas en ellas. Las modificaciones incluyen adicionalmente las desveladas en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.138.045 y 5.218.105, centradas en oligonucleótidos conjugados de poliamina; Patentes de Estados Unidos n.º 5.212.295, 5.521.302, 5.587.361 y 5.599.797, centradas en oligonucleótidos que incorporan enlaces de fósforo quirales que incluyen fosforotioatos; Patentes de Estados Unidos n.º 5.378.825, 5.541.307 y 5.386.023, centradas en oligonucleótidos que tienen estructuras modificadas; Patentes de Estados Unidos n.º 5.457.191 y 5.459.255, centradas en nucleobases modificadas; Patente de Estados Unidos n.º 5.539.082, centrada en ácido nucleicos peptídicos; Patente de Estados Unidos n.º 5.554.746, centrada en oligonucleótidos que tienen estructuras de beta-lactámicos; Patente de Estados Unidos n.º 5.571.902, que desvela la síntesis de oligonucleótidos; Patente de Estados Unidos n.º 5.578.718, que desvela nucleósidos alquiltio; Patente de Estados Unidos n.º 5.506.351, centrada en 2'-O-alquil guanosina, 2,6-diaminopurina y compuestos relacionados; Patente de Estados Unidos n.º 5.587.469, centrada en oligonucleótidos que tienen purinas N-2 sustituidas; Patente de Estados Unidos n.º 5.587.470, centrada en oligonucleótidos que tienen 3-desaza-purinas; Patente de Estados Unidos n.º 5.223.168 y Patente de Estados Unidos n.º 5.608.046, centradas en análogos conjugados de 4'-desmetil nucleósidos; Patentes de Estados Unidos n.º 5.602.240 y 5.610.289, centradas en análogos de oligonucleótidos con estructura modificada; y Patentes de Estados Unidos n.º 6.262.241 y 5.459.255, centradas en, entre otros, procedimientos para la síntesis de 2'-fluoro-oligonucleótidos.

Los enlaces entre los nucleótidos son normalmente el enlace 3'-5' fosfato, que puede ser un enlace fosfodiéster natural, un enlace fosfotioéster y otros enlaces sintéticos más. Los oligonucleótidos que contienen estructuras de fosforotioato tienen mayor estabilidad frente a las nucleasas. Los ejemplos de estructuras modificadas incluyen fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil fosfonatos y otros alquil fosfonatos que incluyen 3'-alquilenfosfonatos, 5'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos. Otros enlaces adicionales incluyen fosfotriéster, siloxano, carbonato, carboxinietiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato que forma puentes, metilfosfonato que forma puentes, fosforotioato que forma puentes y enlaces internucleotídicos de sulfona. Otros enlaces poliméricos incluyen análogos enlazados 2'-5' de estos. Véanse las Patentes de Estados Unidos 6.503.754 y 6.506.735.

Cualquier modificación, incluyendo las ejemplificadas en la descripción anterior, puede incorporarse fácilmente en, y está comprendida dentro del ámbito de los polinucleótidos descritos en el presente documento. El uso de cualquier nucleótido modificado es equivalente al uso de un nucleótido de origen natural que tenga las mismas propiedades de emparejamiento de bases, como entiende un trabajador con habilidades en la técnica.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, el término "complemento", "complementario", "complementariedad", y palabras y frases similares, se refieren a dos secuencias cuyas bases forman pares de bases complementarias, base por base, como entienden de forma convencional los trabajadores con habilidad en campos tales como la bioquímica, la biología molecular, la genómica y campos similares relacionados con el campo de la invención. Dos polinucleótidos monocatenarios (mc) que tengan secuencias complementarias pueden hibridar entre sí en condiciones de tampón y de temperatura adecuadas para formar un polinucleótido bicatenario (bc). A modo de ejemplo no limitativo, si se consideran las bases de origen natural A y (T o U), interactúan entre sí, y G y C interactúan entre sí. A menos que se indique otra cosa, "complementario" pretende significar "completamente complementario", es decir, que cuando dos cadenas de polinucleótidos se alinean entre sí, habrá por lo menos una parte de las cadenas en la que cada base en una secuencia de bases contiguas en una cadena es complementaria a una base que interactúa en una secuencia de bases contiguas de la misma longitud en la cadena opuesta.

Como se usa en el presente documento, "liberar" y palabras y frases similares, cuando se usan en relación con un ácido nucleico, se refieren a un procedimiento mediante el cual se trata una célula o un tejido de forma suficiente para hacer que los ácidos nucleicos contenidos allí estén disponibles para la interacción con reactivos, incluyendo cebadores de PCR, empleados en los procedimientos descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "hibridar", "hibridación" y palabras y frases similares están relacionadas con un procedimiento de formación de un dúplex de ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido al hacer que las cadenas con secuencias complementarias interactúen entre sí. La interacción se produce gracias a las bases

complementarias en cada una de las cadenas que interactúan de forma específica para formar una pareja. La capacidad de las cadenas para hibridar entre sí depende de una diversidad de condiciones, como se expone más adelante. Las cadenas de ácido nucleico hibridan entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada cadena están ocupadas por nucleótidos que pueden interactuar entre sí. Las cadenas de polinucleótido que hibridan entre sí pueden ser completamente complementarias. Como alternativa, dos polinucleótidos hibridados pueden ser “sustancialmente complementarios” entre sí, lo que indica que tienen un pequeño número de bases desemparejadas. En la formación de los pares de bases complementarios participan tanto bases de origen natural como bases modificadas, tales como las descritas en el presente documento. Los trabajadores con habilidad en el campo de la presente invención, incluyendo a modo de ejemplo no limitativo bioquímicos y biólogos moleculares, entenderán que las secuencias de cadenas que forman un dúplex no necesitan ser 100 % complementarias entre sí para que puedan hibridar de forma específica.

Como se usa en el presente documento, “fragmento” y palabras y frases similares se refieren a partes de un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido más cortas que la secuencia completa de una referencia. La secuencia de bases en un fragmento está inalterada con respecto a la secuencia de la parte correspondiente de la referencia; no hay inserciones o deleciones en un fragmento en comparación con la parte correspondiente de la referencia.

Como se usa en el presente documento “medio de escisión” y expresiones y frases similares se refieren a una sustancia que escinde un polinucleótido de una manera específica de secuencia. El medio de escisión interactúa solo con un polinucleótido en una subsecuencia de bases susceptible presente en el mismo, y escinde el polinucleótido en dos trozos más pequeños. Los ejemplos no limitativos del medio de escisión incluyen nucleasas de restricción, ribozimas específicas de secuencia, aptámeros con actividad de escisión y moléculas orgánicas específicas de secuencia con actividad de escisión. También se puede utilizar cualquier medio de escisión equivalente conocido para los trabajadores con habilidad en el campo de la invención.

“ADN complementario” (ADNc), es una molécula de ADN monocatenaria que se copia a partir de un molde de ARNm mediante una enzima transcriptasa inversa, dando como resultado una secuencia complementaria a la del ARNm. Los expertos en la materia también usan el término “ADNc” para referirse a una molécula de ADN bicatenaria que comprende tal molécula de ADN monocatenaria y su cadena de ADN complementaria.

Se proporcionan diversos procedimientos para la detección de la presencia de la mutación T790M del EGFR contenida en una muestra (biopsia de tejido canceroso, células cancerosas obtenidas mediante captura de tejidos por láser procedente de una biopsia o células cancerosas aisladas de suero). Tales procedimientos pueden incluir poner en contacto una muestra de ADN con dos cebadores que están cadena arriba o cadena abajo de la región T790M del EGFR, amplificar la región T790M del EGFR de acuerdo con procedimientos convencionales, y detectar si la secuencia amplificada está presente o ausente en la muestra de ácido nucleico. Por consiguiente, los cebadores capaces de reconocer y de unirse a una región cadena arriba o cadena abajo del T790M del EGFR y las sondas de ácido nucleico que tengan una afinidad por la mutación T790M del EGFR son medios preferentes para realizar tales métodos. Por ejemplo, el exón 20 del EGFR completo puede amplificarse mediante PCR utilizando ADN genómico como molde y utilizando pares de cebadores capaces de reconocer y de unirse, respectivamente, a las secuencias flanqueantes de intrones 5' y 3' del exón 20 (tales secuencias flanqueantes del exón 20 se indican con letras mayúsculas en la SED ID NO: 3 (Tabla 3, véase n.º de Ref. de GenBank NT_033968). Estos pares de cebadores que incluyen el nucleótido 2369 de la secuencia de ADNc del EGFR pueden amplificar un fragmento que puede utilizarse después para secuenciación, análisis de polimorfismo de longitud de restricción o cualquier otra técnica para la determinación de la presencia o ausencia de la mutación C→T de 2369.

Tabla 3.

161101 TTTAGCTTCc TCAGCCCAAG A[Alpha]TAGCAGAA GGGTTAAAAT AAAGTCTGTA TTATGGCTC
 161161 TGTCAAAGGA AGGCCCTGC CTTGGCAGCC AGCCGGAATF AGCAGGGCAG CAGATGCCTG
 161221 ACTCAGTGCA GCATGGATT CCCATAGGGA GCCTGGGGGC ACAGCACAGA GAGACCACTT
 161281 CTCTTTAGAA ATGGGTCCCG GGCAGCCAGG CAGCCTTTAG TCACTGTAGA TTGAATGCTC
 161341 TGTCCATTTC AAAACCTGGG ACTGGTCTAT TGAAAGAGCT TATCCAGCTA CTCTTTGCAG
 161401 AGGTGCTGTG GGCAGGGTCC CCAGCCAAA TGCCACCCA TTTCCAGAG CACAGTCAGG
 161461 GCCAAGCCTG GCCTGTGGGG AAGGGAGGCC TTTCTCCCTG CTGGCTCGGT GCTCCCCGGA
 161521 TGCCTTCTCC ATCGCTTGTG CTCTGCAGCA CCCACAGCCA GCGTTCCTGA TGTGCAGGGT
 161581 CAGTCATTAC CCAGGGTGT CCGGACCCCA CACAGATTCC TACAGGCCCT CATGATATTT
 161641 TAAAACACAG CATCCTCAAC CTTGAGGCGG AGGTCTTCAT AACAAAGATA CTATCAGTTC
 161701 CCAAACCTCAG AGATCAGGTG ACTCCGACTC CTCCTTTATC CAATGTGCTC CTCATGGCCA
 161761 CTGTTGCCCTG GGCCTCTCTG TCATGGGGAA TCCCAGATG CACCCAGGAG GGGCCCTCTC
 161821 CCACTGCATC TGTCACCTCA CAGCCCTGCG TAAACGTCCC TGTGCTAGGT CTTTTGCAGG
 161881 CACAGCTTTT CCTCCATGAG TACGTATTTT GAAACTCAAG ATCGCATTCA TGCCTCTCA
 161941 CCTGGAAGGG GTCCATGTGC CCCTCCTTCT GGCCACCATG CGAAGCCACA CTGACGTGCC
 162001 TCTCCCTCCC **TCCAGgaagc ctacgtgatg gccagcgtgg acaaceccca cgtgtgccc**
 162061 **ctgctgggca totgctcac ctccaccgtg cagctcatca cgcagctcat gcctctggc**
 162121 **tgctctctgg actatgtccg ggaacacaaa gacaatattg gctcc[sigma]agta cctgctcaac**
 162181 **tggtgtgtg[sigma] agatcgcaaa g**TAATCAGG GAAGGGAGAT ACGGGGAGGG GAGATAAGGA
 162241 GCCAGGATCC TCACATGCGG TCTGCGCTCC TGGGATAGCA AGAGTTTGCC ATGGGGATAT
 162301 GTGTGTGCGT GCATGCAGCA CACACACATT CCTTTATTTT GGATTCAATC AAGTTGATCT
 162361 TCTTGTGCAC AAATCAGTGC CTGTCCCATC TGCATGTGGA AACTCTCATC AATCAGCTAC
 162421 CTTTGAAGAA TTTTCTCTTT ATTGAGTGCT CAGTGTGGTC TGATGTCTCT GTTCTTATTT
 162481 CTCTGGAATF CTTTGTGAAT ACTGTGGTGA TTTGTAGTGG AGAAGGAATA TTGCTTCCCC
 162541 CATTCAAGGAC TTGATAACAA GGTAAGCAAG CCAGGCCAAG GCCAGGAGGA CCCAGGTGAT
 162601 AGTGGTGGAG TGGAGCAGGT GCCTTGCAGG AGGCCAGTG AGGAGGTGCA AGGAGCTGAC
 162661 AGAGGGCGCA GCTGCTGCTG CTATGTGGCT GGGGCCTTGG CTAAGTGTCC CCCTTTCAC
 162721 AGGCTCGCTC CAGAGCCAGG GCGGGGCTGA GAGAGCAGAG TGGTCAGGTA GCCCTGCCTG
 162781 GGTGCTGGAG ACAGGCACAG AACAACAAGC C[Alpha]GGTATTTT ACAGCTGGTG CGGACCCAGA
 162841 AAGACTTCTG CTTTTGCCCC AAACCCCTCC CATCTCCATC CCAGTCTTGC ATCAGTTATF
 162901 TGCACCTAAC TTGCTAAGTC CTATTTTTTT CTAACAATGG GTATACATTT CATCCCATTG
 162961 ACTTTAAAGG ATTTGCAGGC AGGCCCTGTC TCTGAGAATA CGCCGTTGCC CGTCATCTCT
 163021 CTCCGACAGC AGGGCAGGGG GTCCAGAGAT GTGCCAGGGA CCAGAGGGAG GGAGCAGACA
 163081 CCCACCCGGC CTGGGCAGGT CCTCCTCATT GCTTGCATCC GCCTGGTTAG CAGTGGCAGT
 163141 cAGTccTGcc GAGTCATTG TGAGGCGCTC ACCCAACTCC AGGCAGATGT A[Alpha]AAGGTGAC
 163201 CTACAAGAAG ACAAACAAA ACATCTGGAG CGCTCTTATG CCAGCATCTG CCCTTGACAC
 (SEQ ID NO.3)

5 Sin limitarse a estos métodos de diagnóstico, se proporciona un procedimiento para la detección de la mutación T790M del EGFR mediante el cual se utiliza una enzima de restricción para reconocer la carencia o la presencia de un sitio de restricción en el codón alélico. Existe un sitio de restricción que conduce a la escisión productiva del polinucleótido, utilizando una nucleasa de restricción convenientemente selectiva, cuando está presente el alelo de tipo silvestre o el alelo polimórfico.

También se prevé en el presente documento un kit de diagnóstico para la detección del EGFR mutante T790M relacionado con malignidad en un ser humano. Tal kit preferentemente incluye múltiples envases en los que se

incluye un conjunto de cebadores útiles para la detección por PCR de la mutación T790M del EGFR, y de forma opcional, un control positivo que comprende la secuencia del EGFR mutada y un control negativo que comprende una secuencia del EGFR no mutada.

La Figura 2 proporciona representaciones esquemáticas de determinadas realizaciones de los cebadores descritos en el presente documento. La divulgación muestra secuencias que sirven como cebadores para amplificar segmentos de secuencias genómicas o de ADNc del EGFR que incluyen la base que corresponde a la posición 2369 del ADNc del EGFR. Las secuencias de cebadores desveladas, tales como las SEQ ID NO: 4-7 y 12-15, se representan de forma esquemática mediante los bloques ligeramente sombreados en la Figura 2. La Figura 2, a) ilustra una realización en la que el cebador desvelado mostrado como "SEQ" puede de forma opcional incluirse en un polinucleótido más grande cuya longitud global puede variar hasta 200 nucleótidos.

La divulgación proporciona adicionalmente una secuencia de cebador que es un fragmento de cualquiera de las secuencias de cebador anteriores, las SEQ ID NO: 4-7 y 12-15, que es por lo menos de 11 nucleótidos de longitud (y como máximo una base más corto que la SEQ ID NO: de referencia ilustrada en la Figura 2, b)), así como una secuencia de cebador en la que hasta 5 nucleótidos pueden diferir de las secuencias proporcionadas en las SEQ ID NO: 4-7 y 12-15 (ilustradas en la Figura 2, c), que muestran, en este ejemplo, tres bases variantes representadas por las tres barras verticales más oscuras).

Adicionalmente, la divulgación proporciona una secuencia que es un complemento de cualquiera de las secuencias descritas anteriormente (mostrada en la Figura 2, d), y denominada "COMPL"). Cualquiera de estas secuencias está incluida en los oligonucleótidos o polinucleótidos de la divulgación. Como se indica, cualquier polinucleótido cebador de la divulgación puede de forma opcional incluir bases adicionales hasta el límite de 200 nucleótidos.

Los cebadores de la divulgación están diseñados para ser "sustancialmente" complementarios a cada cadena del locus genómico o del ADNc a amplificar. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas cadenas en condiciones que permitan que se desarrolle la reacción en cadena de la polimerasa. En otras palabras, los cebadores deberían tener suficiente complementariedad con las secuencias 5' y 3' que flanquean la mutación como para hibridar con la misma y permitir la amplificación del locus genómico. Por lo tanto, se prevé en el presente documento que una secuencia de cebador no necesita ser completamente complementaria a su secuencia diana. "Sustancialmente idéntica" y frases similares que se refieren a secuencias de oligonucleótidos, por lo tanto, describen la capacidad funcional para hibridar o aparearse con la especificidad suficiente para distinguir entre la presencia o ausencia de una mutación, tal como un PMN identificado en el presente documento. Esto se puede medir por las temperaturas de fusión, que son suficientemente distintas para permitir la identificación fácil de si el oligonucleótido se une a la secuencia génica normal o del EGFR mutante T790M.

Se emplean cebadores de oligonucleótido de la divulgación en el procedimiento de amplificación, que es una reacción en cadena enzimática que produce cantidades exponenciales del locus polimórfico en relación al número de etapas de reacción implicadas. Normalmente, un cebador es complementario a la cadena negativa (-) del locus polimórfico y el otro es complementario a la cadena positiva (+). El apareamiento de los cebadores con el ácido nucleico desnaturalizado seguido de la extensión con una enzima, la ADN polimerasa, y nucleótidos, da como resultado cadenas + y - recién sintetizadas que contienen la secuencia del locus polimórfico diana. Debido a que estas secuencias recién sintetizadas son también moldes, los ciclos repetidos de desnaturalización, apareamiento de cebador y extensión dan como resultado una producción exponencial de la región (es decir, la secuencia del locus polimórfico diana) definida por los cebadores. El producto de la reacción en cadena es un dúplex de ácido nucleico discreto, correspondiendo los extremos a los extremos de los cebadores específicos empleados.

Síntesis de Polinucleótidos. Los cebadores de oligonucleótido de la divulgación se pueden preparar utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como procedimientos de fosfotriéster y fosfodiéster convencionales o realizaciones automatizadas de los mismos. En una de tales realizaciones automatizadas, se utilizan dietilfosforamiditas como materiales de partida y se pueden sintetizar como describe Beaucage, y col., Tetrahedron Letters, 22: 1859-1862, (1981). En la Patente de Estados Unidos n.º 4.458.066 se describe un procedimiento para la síntesis de oligonucleótidos sobre un soporte sólido modificado.

Los oligonucleótidos y polinucleótidos se pueden preparar mediante técnicas de síntesis convencionales, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automatizado. Los procedimientos para la síntesis de oligonucleótidos incluyen procedimientos químicos bien conocidos, que incluyen, pero si limitación, adición secuencial de fosforamiditas nucleotídicas sobre partículas derivatizadas en superficie, como describe T. Brown y Dorcas JS Brown en Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach, F. Eckstein, editor, Oxford University Press, Oxford, pág. 1-24 (1991), incorporado como referencia en el presente documento.

Un ejemplo de un procedimiento sintético utiliza fosforamiditas de ARN Expedite y fosforamidita de timidina (Proligo, Alemania). Los oligonucleótidos sintéticos se desprotegen y se purifican por gel (Elbashir y col. (2001) Genes & Dev. 15, 188-200), seguido de purificación por cartucho C18 de Sep-Pak (Waters, Milford, Mass., USA) (Tuschl y col. (1993) Biochemistry, 32: 11658-11668). Otros procedimientos de síntesis de oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, síntesis de oligonucleótidos en fase sólida de acuerdo con los procedimientos de fosfotriéster y fosfodiéster (Narang, y col., (1979) Meth. Enzymol. 68: 90), y con el procedimiento del H-fosfonato (Garegg, P. J, y

- col., (1985) "Formation of internucleotidic bonds via phosphonate intermediates", Chem. Scripta 25, 280-282; y Froehler, B. C, y col., (1986a) "Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates", Nucleic Acid Res., 14, 5399-5407, entre otros) y la síntesis sobre un soporte (Beaucage, y col. (1981) Tetrahedron Letters 22: 1859-1862) así como técnicas de fosforamido (Caruthers, M. H., y col., "Methods in Enzymology", Vol. 154, pág. 287-314 (1988), Patentes de Estados Unidos 5.153.319, 5.132.418, 4.500.707, 4.458.066, 4.973.679, 4.668.777 y 4.415.732, y otros descritos en "Synthesis and Applications of DNA and RNA", S. A. Narang, editor, Academic Press, Nueva York, 1987, y las referencias contenidas en ellos, y técnicas distintas a la técnica de la fosforamido. La síntesis en fase sólida ayuda a aislar el oligonucleótido de impurezas y de los excesos de reactivos. Una vez escindido del soporte sólido, el oligonucleótido se puede aislar adicionalmente mediante técnicas conocidas.
- 5
10
15
20
- Cualquier muestra de ensayo de ácido nucleico, en forma purificada o sin purificar, puede utilizarse como ácido nucleico (o ácidos nucleicos) de partida, a condición de que contenga, o se sospeche que contiene, la secuencia de ácido nucleico específica que contiene el locus polimórfico. Por lo tanto, el procedimiento puede amplificar, por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo ARN mensajero, en el que el ADN o ARN puede ser monocatenario o bicatenario. En caso de que se vaya a utilizar ARN como molde, se utilizarían enzimas y/o condiciones óptimas para la transcripción inversa del molde a ADNc. Además, puede utilizarse un híbrido ADN-ARN que contenga una cadena de cada uno. También se puede emplear una mezcla de ácidos nucleicos o los ácidos nucleicos se pueden producir en una reacción de amplificación previa en el presente documento, de este modo pueden utilizarse los mismos cebadores o cebadores distintos. La secuencia de ácido nucleico específica a amplificar, es decir, el locus polimórfico, puede ser una fracción de una molécula más grande o puede estar presente de forma inicial como una molécula discreta, de forma que la secuencia específica constituye el ácido nucleico completo. No es necesario que la secuencia a amplificar esté presente de forma inicial en una forma pura. Puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como contenida en ADN humano completo.
- 25
- El ADN utilizado en el presente documento se puede extraer a partir de una muestra corporal, material tisular y similar por una diversidad de técnicas tales como las descritas en Maniatis, y col. en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y., p 280-281, 1982). Si la muestra extraída está impura, puede tratarse antes de la amplificación con una cantidad de un reactivo eficaz para abrir las células, o las membranas celulares animales de la muestra, y para exponer y/o separar la cadena (o cadenas) del ácido nucleico (o ácidos nucleicos). Esta etapa de lisis y desnaturalización del ácido nucleico para exponer y separar las cadenas permitirá que se produzca la amplificación mucho más fácilmente.
- 30
- El agente para la polimerización del ADN puede ser cualquier compuesto o sistema que funcione para llevar a cabo la síntesis de los productos de extensión del cebador, incluyendo enzimas. Las enzimas adecuadas para este fin incluyen, por ejemplo, muteínas de polimerasa, transcriptasa inversa, otras enzimas que incluyen enzimas termoestables (es decir, las enzimas que realizan la extensión del cebador después de someterse a temperaturas suficientemente elevadas para provocar la desnaturalización), tales como la polimerasa Taq. La enzima adecuada facilitará la combinación de los nucleótidos de la manera apropiada para formar los productos de extensión del cebador que son complementarios a cada cadena de ácido nucleico del locus polimórfico. En general, la síntesis se iniciará en el extremo 3' de cada cebador y procederá en la dirección 5' a lo largo de la cadena molde, hasta que se interrumpa la síntesis, produciendo moléculas de distintas longitudes.
- 35
- Los productos de amplificación pueden detectarse mediante su análisis en transferencias de Southern sin utilizar sondas radiactivas. En tal procedimiento, por ejemplo, se amplifica una pequeña muestra de ADN que contiene un nivel muy bajo de la secuencia de ácido nucleico del locus polimórfico y se analiza mediante una técnica de transferencia de Southern o, de forma similar, utilizando análisis por transferencia puntual. El uso de marcadores o sondas no radiactivas se facilita por el alto nivel de la señal amplificada. Como alternativa, las sondas utilizadas para detectar los productos amplificados se pueden marcar directa o indirectamente de forma detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales o una enzima. Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados para unir a la sonda, o serán capaces de determinarlos, utilizando experimentación de rutina. En la realización preferente, los productos de amplificación se pueden determinar separando la mezcla en un gel de agarosa que contiene bromuro de etidio que hace que el ADN sea fluorescente.
- 40
45
- Las secuencias amplificadas mediante los procedimientos de la invención adicionalmente se pueden evaluar, detectar, clonar, secuenciar y similares, ya sea en solución o después de la unión a un soporte sólido, mediante cualquier procedimiento habitualmente aplicado a la detección de una secuencia de ADN específica tal como PCR, restricción de oligómero (Sa[ϵ][α], y col., Bio/Technology, 3: 1008-1012, (1985)), análisis por sonda de oligonucleótido específico de alelo (ASO) (Conner, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 278, (1983)), ensayos de ligamiento de oligonucleótido (OLA) (Landgren, y col., Science, 241: 1007, (1988)), y similares. Se han revisado las técnicas moleculares para el análisis del ADN (Landgren, y col., Science, 242: 229-237, (1988)).
- 50
55
- Preferentemente, el procedimiento de amplificación es mediante PCR, como se describe en el presente documento y como se usa comúnmente por los expertos en la materia. Se han descrito procedimientos alternativos de amplificación y pueden emplearse también siempre que el locus de EGFR amplificado por PCR utilizando los cebadores de la divulgación se amplifique de forma similar por los medios alternativos. Tales sistemas de amplificación alternativos incluyen, pero sin limitación, la replicación de secuencia autosostenida, que comienza con
- 60

una secuencia de ARN corta de interés y un promotor de T7. La enzima transcriptasa inversa copia el ARN en forma de ADNc seguido de la degradación del ARN transcrito. Otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos es la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) que utiliza la transcripción inversa y la ARN polimerasa T7 e incorpora dos cebadores para dirigir su esquema de ciclado. NASBA puede comenzar con ADN o ARN y finalizar con cualquiera, y amplifica hasta 10^8 copias al cabo de 60 a 90 minutos. Como alternativa, el ácido nucleico se puede amplificar mediante transcripción activada por ligamiento (LAT). LAT trabaja a partir de un molde monocatenario con un único cebador que es parcialmente monocatenario y parcialmente bicatenario. La amplificación se inicia ligando un ADNc al oligonucleótido promotor y al cabo de unas pocas horas, la amplificación es de 10^8 a 10^9 veces. El sistema de replicasa QB se puede utilizar uniendo una secuencia de ARN denominada MDV-I a un ARN complementario para una secuencia de ADN de interés. Después de mezclarlo con la mezcla, el ARN híbrido encuentra su complemento entre los ANRm de la muestra de ensayo y se une, activando la replicasa para copiar la secuencia acoplada de interés. Otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la ligasa (LCR), trabaja utilizando dos mitades de una secuencia de interés marcadas de forma distinta que están enlazadas covalentemente mediante la ligasa en presencia de la secuencia contigua en una muestra, formando una nueva diana. La técnica de amplificación de ácidos nucleicos de reacción en cadena de reparación (RCR) utiliza dos pares de sondas de oligonucleótido complementarias y específicas para la diana, polimerasa termoestable y ligasa, y nucleótidos de ADN que amplifican de forma geométrica las secuencias deseadas. Un hueco de 2 bases separa los pares de sondas de oligonucleótido, y la RCR rellena y empalma el hueco, imitando la reparación de ADN normal. La amplificación de ácidos nucleicos mediante activación por desplazamiento de cadena (SDA) utiliza un cebador corto que contiene un sitio de reconocimiento para Hinc II con una protuberancia corta en el extremo 5' que se une al ADN diana. Una ADN polimerasa rellena en la parte del cebador opuesta a la protuberancia con análogos de adenina que contienen azufre. Se añade Hinc II, pero solo corta la cadena de ADN no modificada. Una ADN polimerasa que carece de actividad 5' exonucleasa entra en el sitio del corte y comienza a polimerizar, desplazando la cadena de cebador inicial cadena abajo y fabricando una nueva que sirve como más cebador. La SDA produce una amplificación de más de 10^7 veces en 2 horas a 37 grados C. A diferencia de la PCR y la LCR, la SDA no necesita el ciclado de temperatura instrumentado. Otro sistema de amplificación útil en el procedimiento de la invención es el sistema de replicasa QB. Aunque la PCR es el procedimiento preferente de amplificación de la invención, también pueden utilizarse estos otros procedimientos para amplificar el locus como se describe en el procedimiento de la invención.

Se pueden utilizar una diversidad de procedimientos bien conocidos en la técnica para la detección de variaciones de secuencia predeterminadas mediante hibridación específica de alelo. Preferentemente, el gen de prueba se sondea con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO); y cada ASO contiene la secuencia de una mutación conocida. El análisis por ASO detecta variaciones de secuencia específicas en un fragmento polinucleótido diana mediante el análisis de la capacidad de una sonda de oligonucleótido específica para hibridar con el fragmento de polinucleótido diana. Preferentemente, el oligonucleótido contiene la secuencia mutante (o su complemento). La presencia de una variación de secuencia en la secuencia diana se indica mediante hibridación entre la sonda de oligonucleótido y el fragmento diana en condiciones en las que una sonda de oligonucleótido que contiene una secuencia normal no hibrida con el fragmento diana. Una falta de hibridación entre la sonda de oligonucleótido de la variante de secuencia (por ejemplo, mutante) y el fragmento de polinucleótido diana indica la ausencia de la variación de secuencia específica (por ejemplo, mutación) en el fragmento diana. En una realización preferente, las muestras de prueba se sondean en un formato puntual convencional. Cada región dentro del gen de prueba que contiene la secuencia correspondiente al ASO se aplica de forma individual a una superficie sólida, por ejemplo, como un punto individual sobre una membrana. Cada región individual puede producirse, por ejemplo, como un producto de amplificación de PCR distinto utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la realización experimental expuesta en Mullis, K. B., 1987, Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202).

Los formatos basados en membrana que pueden utilizarse como alternativas al formato de transferencia puntual para realizar los análisis de ASO incluyen, pero sin limitación, transferencia puntual inversa, (ensayo de amplificación múltiple), y ensayo de diagnóstico específico de alelo múltiple (MASDA).

En un formato de transferencia puntual inversa, las sondas de oligonucleótido o polinucleótido que tienen la secuencia conocida se inmovilizan sobre la superficie sólida y posteriormente se hibridan con la muestra de polinucleótido de prueba marcada. En esta situación, los cebadores se pueden marcar o los NTP pueden marcarse antes de la amplificación para preparar una muestra de polinucleótido de prueba marcada. Como alternativa, la muestra de polinucleótidos de prueba se puede marcar después del aislamiento y/o síntesis. En un formato múltiple, las muestras individuales contienen múltiples secuencias diana dentro del gen de prueba, en lugar de solo una única secuencia diana. Por ejemplo, en el mismo punto de muestra se aplican múltiples productos de PCR conteniendo cada uno por lo menos una de las secuencias diana de ASO. Se pueden producir múltiples productos de PCR de forma simultánea en una única reacción de amplificación utilizando los procedimientos de Caskey y col., Patente de Estados Unidos n.º 5.582.989. Por lo tanto, se puede sondear la misma transferencia mediante cada ASO, cuya secuencia correspondiente está representada en los puntos de muestra.

Un formato MASDA expande el nivel de complejidad del formato múltiple utilizando múltiples ASO para sondear cada transferencia (que contiene puntos con múltiples secuencias diana). Este procedimiento se describe en detalle en la Patente de Estados Unidos n.º 5.589.330 de A. P. Shuber, y en Michalowsky y col., American Journal of Human Genetics, 59 (4): A272, póster 1573 (octubre de 1996), cada uno de los cuales se incorpora en el presente

documento como referencia en su totalidad. En primer lugar, se detecta la hibridación entre las múltiples sondas de ASO y la muestra inmovilizada. Este procedimiento se basa en la predicción de que la presencia de una mutación entre las múltiples secuencias diana en un punto dado es suficientemente rara como para que cada señal de hibridación positiva sea resultado de un único ASO dentro de la mezcla de sondas que hibrida con la correspondiente diana mutante. Después, el ASO que hibrida se identifica aislándolo del sitio de hibridación y determinando su secuencia de nucleótidos.

Diseño de una sonda de oligonucleótido específico de alelo (ASO)

Una sonda de oligonucleótido específico de alelo es un polinucleótido monocatenario corto que se modifica por ingeniería genética para hibridar de forma exacta con una secuencia diana en un conjunto dado de condiciones. De forma rutinaria, las sondas ASO se diseñan para contener secuencias idénticas al alelo normal y a la variación de secuencia, respectivamente. La hibridación de la sonda con la diana permite la discriminación de una muestra variante. Bajo condiciones rigurosas, una sonda con una variación tan simple como un único par de bases no hibridará con una secuencia normal debido a un efecto desestabilizador del dúplex normal-mutante (Ikuta, S. y col., *Nucleic Acids Research*, 15: 797 -811 (1987).

El diseño de una sonda de hibridación ASO debe satisfacer dos requisitos básicos. (Current Protocols in Human Genetics, sección 9.4, (1995)). En primer lugar, las sondas que se utilizan juntas en el mismo grupo deberían ser aproximadamente de la misma longitud. Aunque la longitud convencional de una sonda es de manera óptima 17 pares de bases, el intervalo puede ser tan corto como aproximadamente 14 o tan largo como aproximadamente 27. Si la mutación contiene una inserción larga, puede ser conveniente una sonda más larga. En segundo lugar, la región con falta de coincidencia no debería estar localizada en el extremo de la sonda de 17 pares de bases, sino aproximadamente en la mitad de la secuencia, aproximadamente a 5-7 bases desde el extremo <5> de la sonda. Además, la ubicación de una falta de coincidencia, en el caso de una sonda más larga, no debería estar en el extremo, sino en una posición que permita la fuerte hibridación y estabilización de la cadena de polinucleótido. Para minimizar los efectos de las variaciones en la composición de bases de las sondas, se utiliza cloruro de tetrametilamonio como en el tampón del híbrido de ASO (Shuber, T., Patente de Estados Unidos n.º 5.633.134). De forma convencional, las sondas ASO se sintetizan en un sintetizador de ADN. Pueden marcarse con agentes de detección isotópicos o no isotópicos utilizando medios con los que están familiarizados los expertos en la materia. El procedimiento descrito en esta solicitud para fabricar y utilizar sondas puede ser aplicable para otras secuencias génicas.

Los materiales adecuados que pueden utilizarse en los formatos de transferencia puntual, transferencia puntual inversa, múltiplex y MASDA son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación membranas de nylon y de nitrocelulosa.

Cuando las secuencias diana se producen mediante amplificación por PCR, el material de partida puede ser ADN cromosómico, en cuyo caso el ADN se amplifica de forma directa. Como alternativa, el material de partida puede ser ARNm, en cuyo caso el ARNm en primer lugar se transcribe de forma inversa en ADNc y después se amplifica de acuerdo con la técnica bien conocida de RT-PCR (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.561.058 de Gelfand y col.).

Los procedimientos descritos anteriormente son adecuados para la exploración moderada de un número limitado de variaciones de secuencia. Sin embargo, con la necesidad en el diagnóstico molecular de una exploración a gran escala rápida, económica, se han desarrollado tecnologías que integran el concepto básico de ASO, pero que superan con creces la capacidad para la detección de mutaciones y el número de muestras. Estos procedimientos alternativos a los descritos anteriormente incluyen, pero sin limitación, técnicas basadas en secuencia de matrices de microplaca a gran escala. El uso de matrices a gran escala permite el análisis rápido de muchas variantes de secuencia. Una revisión de las diferencias en la aplicación y desarrollo de matrices de microplaca está cubierta en Southern, E. M, *Trends In Genetics*, 12: 110-115 (marzo de 1996) y Cheng y col., *Molecular diagnosis*, 1: 183-200 (septiembre de 1996). Existen varios enfoques que implican la fabricación de matrices de microplaca. Las diferencias incluyen, pero no se restringen a: tipo de soporte sólido para unir los oligonucleótidos inmovilizados, técnicas de marcaje para la identificación de variantes y cambios en las técnicas basadas en secuencias del polinucleótido diana para la sonda.

En Hacia y col., *Nature Genetics*, 14: 441-447 (1996), que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad, se describe con detalle una metodología prometedora para el análisis a gran escala en "microplacas de ADN". Como se describe en Hacia y col., se inmovilizan matrices de alta densidad de más de 96.000 oligonucleótidos, cada uno de 20 nucleótidos de longitud, en una única microplaca de vidrio o de silicio usando síntesis química dirigida por luz. Dependiendo del número y del diseño de la sonda de oligonucleótido, potencialmente pueden buscarse alteraciones en cada base en una secuencia. Por lo tanto, los oligonucleótidos aplicados en la microplaca pueden contener variaciones de secuencia que todavía no se sabe que se produzcan en la población, o pueden limitarse a mutaciones que se sabe que se producen en la población.

Antes de la hibridación con las sondas de oligonucleótido en la microplaca, la muestra de ensayo se aísla, amplifica y marca (por ejemplo, con marcadores fluorescentes) por medios bien conocidos para los expertos en la materia.

Después, la muestra de polinucleótido de muestra se hibrida con los oligonucleótidos inmovilizados. La intensidad de las técnicas basadas en secuencia del polinucleótido diana para la sonda inmovilizada se cuantifica y compara con una secuencia de referencia. La información genética resultante se puede utilizar en el diagnóstico molecular.

5 En otra realización de la divulgación, se proporciona un procedimiento para diagnosticar la causa subyacente para un sujeto que tiene una recaída de cáncer, o una recaída de cáncer de pulmón, que comprende secuenciar un ácido nucleico diana de una muestra procedente de un sujeto después de la amplificación del ácido nucleico diana. El gen del EGFR, o fragmentos del mismo, se puede clonar y después secuenciar para determinar la presencia o ausencia de una mutación. En tal situación, solo se necesita comparar la secuencia obtenida con un gen del EGFR de origen natural (de tipo silvestre), o parte del mismo.

10 Se pueden utilizar otros procedimientos para la secuenciación del ADN tales como los de Sanger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463 (1977) o de Maxam y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 560 (1977) u otros métodos conocidos en la técnica.

15 En otra realización de la divulgación, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de la causa subyacente para un sujeto que tiene una recaída de cáncer que comprende poner en contacto un ácido nucleico diana de una muestra procedente de un sujeto con un reactivo que detecta la presencia de la mutación de la presente divulgación y detectar la mutación

20 Otro procedimiento comprende poner en contacto un ácido nucleico diana de una muestra procedente de un sujeto con un reactivo que detecta la presencia de la mutación y la detectar la mutación. Varios procedimientos de hibridación son bien conocidos para los expertos en la materia. Muchos de ellos son útiles para llevar a cabo la divulgación.

25 Los materiales para su uso en el procedimiento de la divulgación son idealmente apropiados para la preparación de un kit de diagnóstico. Tal kit puede comprender un medio de transporte que esté compartimentalizado para recibir en confinamiento cerrado uno o más medios de envase tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios de envase uno o más de los elementos separados a utilizar en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios de envase puede comprender medios para la amplificación del ADN del EGFR, o un fragmento del mismo, comprendiendo dichos medios la enzima (o enzimas) y cebadores de oligonucleótido necesarios para la amplificación de dicho ADN diana procedente del sujeto. Otro envase puede contener sondas de oligonucleótido para la detección de la presencia o ausencia de una mutación. Como alternativa, otro envase puede contener una enzima de restricción que reconoce la secuencia mutante pero no el tipo silvestre, o viceversa.

30 Otros procedimientos pueden incluir poner en contacto una muestra de tejido canceroso procedente de un paciente con cáncer con un anticuerpo que detecta de forma específica la forma T790M del EGFR de la proteína EGFR, pero no la proteína EGFR que no contiene esta mutación. Como alternativa, un extracto de proteína procedente de una muestra de tejido canceroso procedente de un paciente con cáncer se puede obtener y analizar mediante transferencia de Western, ELISA u otras técnicas de detección de proteínas, para determinar la presencia o ausencia del mutante T790M del EGFR utilizando un anticuerpo específico para detectar esta mutación y no la proteína EGFR que no contiene esta mutación. El anticuerpo para detectar el mutante T790M del EGFR puede ser un anticuerpo obtenido a partir de un hibridoma. Un procedimiento típico para preparar hibridomas es como sigue: (a) inmunizar ratones con un determinado inmunógeno; (b) retirar los bazo de los ratones inmunizados y preparar una suspensión de bazo en un medio apropiado; (c) fusionar las células esplénicas suspendidas con células de mieloma de ratón; (d) diluir y cultivar la mezcla de células esplénicas no fusionadas, las células de mieloma no fusionadas y las células fusionadas en un medio selectivo que no mantendrá el crecimiento de las células de mieloma o de las células esplénicas no fusionadas; (e) evaluar la presencia de anticuerpo para el inmunógeno en el sobrenadante en cada envase que contiene hibridoma y (f) seleccionar y clonar hibridomas que producen los anticuerpos deseados. Una vez que el hibridoma deseado se ha seleccionado y clonado, el anticuerpo resultante se produce mediante cultivo *in vitro* del hibridoma deseado en un medio adecuado. Como procedimiento alternativo, el hibridoma deseado se puede inyectar directamente en ratones para producir cantidades concentradas de anticuerpo [Kennett, y col., (1981) Ed., Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A new dimension in biological analyses, Plenum Press, Nueva York]. Los hibridomas producidos mediante fusión de células esplénicas murinas y de células de mieloma murinas se han descrito en la literatura por Kohler y col.5 en Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976); por Milstem y col. en Nature, 266, 550 (1977); y por Walsh, Nature, 266, 550 (1977); y por Walsh, Nature, 266, 495 (1977). Herzenberg y Milstem, en Handbook on Experimental Immunology, ed. Weir (Blackwell Scientific, Londres), 1979, páginas 25.1 a 25.7, así como en Kennett y col. citado anteriormente, también exponen con cierto detalle la técnica. Las patentes referentes a anticuerpos monoclonales frente a tumores humanos producidos mediante la tecnología del hibridoma incluyen a las Patentes de Estados Unidos n.º 4.182.124 y 4.196.265. La Patente de Estados Unidos n.º 4.350.683 es representativa de la técnica que concierne a anticuerpos monoclonales que tienen especificidad por antígenos en células de carcinoma.

60 Las mutaciones específicas en el dominio tirosina quinasa del EGFR están asociadas con la sensibilidad a gefitinib o erlotinib, pero todavía no se han comunicado los mecanismos de la resistencia adquirida. Basándose en estudios análogos en otras enfermedades con otro inhibidor de quinasa, imatinib, se predijo que una única sustitución de aminoácido de treonina a metionina en la posición 790 en el dominio quinasa del EGFR de tipo silvestre conduce a

la resistencia a fármaco, incluso antes de que se comunicara la asociación de las mutaciones de los exones 19 y 21 de EGFR con la respuesta a fármacos en el CPCNP. La transición de C a T que reemplaza la Thr-766 con la mutación de metionina (ACG a ATG) se mostró *in vitro* en el contexto del EGFR de tipo silvestre, que confiere resistencia a gefitinib [21] y un inhibidor de quinazolina relacionado, PD153035 [22].

- 5 Se conocen una diversidad de ensayos para evaluar la presencia de mutaciones en los ácidos nucleicos. Estos incluyen, a modo de ejemplos no limitativos, la detección mediante polimorfismo de conformaciones monocatenarias en electroforesis en gel [29], detección de alelos mediante bioluminiscencia en un dispositivo de microfluidos [30] y la detección de alelos en un soporte sólido o micromatriz mediante extensión de cebador específica de alelo [31, 32].

Ejemplos

10 Materiales y procedimientos

Obtención de tejidos

Las muestras de ensayo tumorales, que incluían bloques de parafina, biopsias con aguja fina y derrames pleurales, se obtuvieron a través de protocolos aprobados por el Institutional Review Board of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (protocolo 92-055 [7] y protocolo 04-103 [Protocolo S1]). Todos los pacientes proporcionaron el consentimiento con total conocimiento de causa.

15

Análisis mutacionales del EGFR y KRAS en tumores de pulmón

Se extrajo ADN genómico procedente de muestras de ensayo tumorales, y los cebadores para los análisis del EGFR (exones 18-24) y KRAS2 (exón 2) eran como está publicado [3,7]. Todas las reacciones de secuenciación se realizaron en las direcciones directa e inversa, y todas las mutaciones se confirmaron por lo menos dos veces a partir de aislados de PCR independientes.

20

La mutación del exón 20 (T790M) también se detectó mediante análisis de longitud de productos de PCR marcados de forma fluorescente (FAM) en un dispositivo de electroforesis capilar (ABI 3100 Avant, Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos), basándose en un sitio de restricción para NlaIII nuevo creado por la mutación T790M (2369 C→T). Se utilizaron los siguientes cebadores.

25

EGFR Ex20F, 5'-FAM-CTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGAT-3' (SEQ ID NO:4) y

EGFR Ex20R 5'-TTTGCGATCTGCACACACCA-3' (SEQ ID NO:5). Utilizando diluciones mezcladas en serie de ADN procedente de líneas celulares de CPCNP (H1975, positiva para L858R y T790M; H-2030, EGFR de tipo silvestre) para la calibración, este ensayo detecta la presencia de la mutación T790M cuando el ADN de H1975 constituye el 3% o más del ADN total analizado, en comparación con una sensibilidad del 6% para la secuenciación directa (dato no mostrado), con la advertencia de que el alelo que contiene la mutación T790M se amplifica aproximadamente dos veces en las células H1975.

30

RT-PCR

Se utilizaron los siguientes cebadores para generar fragmentos del ADNc de EGFR que se extienden a lo largo del exón 20:

35

EGFR 2095F 5'-CCCAACCAAGCTCTCTTGAG-S' (SEQ ID NO:6) y

EGFR 2943R 5'-ATGACAAGGTAGCGCTGGGGG-S' (SEQ ID NO:7). Las secuencias que son diana de EGFR 2095F y EGFR 2943R se muestran subrayadas en la Tabla 1. Los productos de PCR se ligaron en plásmidos utilizando el kit TOPO TA-cloning (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se secuenciaron preparaciones a pequeña escala de ADN de clones individuales utilizando el sitio de cebado T7 del vector de clonación.

40

Análisis funcionales de los EGFR mutantes

Se introdujeron mutaciones en los ADNc de EGFR de tipo silvestre de longitud completa y mutante utilizando el Kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange (Stratagene, La Jolla, California, Estados Unidos) y se clonaron en los vectores de expresión como se describe [3]. Para generar la delección (del) L747-E749; mutante A750P, se utilizaron los siguientes cebadores:

45

directo 5'-TAAATTCCTCGCTATCAAGGAGCCAACATCTCCGAAA GCCAACAAGG-3' (SEQ ID NO:8) e

inverso 5'-CCTTGTGGCTTTCGGAGATGTTGGCTCCTTGATAGCGACG GGAATTTT A-3' (SEQ ID NO:9).

Para introducir la mutación T790M se utilizaron los siguientes cebadores:

directo 5'-AGCTC ATC ATGC AGCTC AT-3' (SEQ ID NO: 10) e

inverso 5'-ATGAGCTGCATGATGAGCT-S' (SEQ ID NO: 11).

El ADNc del mutante L858R se generó previamente [3]. Todos los clones mutantes volvieron a secuenciarse completamente de forma bidireccional para asegurarse de que no se habían introducido mutaciones adicionales. Se expresaron de forma transitoria diversos EGFR en células de riñón embrionario de ser humano 293T como está publicado [3]. Las células se trataron con distintas concentraciones de gefitinib o erlotinib.

Inmunotransferencia

Para los detalles sobre lisis celular, inmunotransferencia y reactivos de anticuerpo, véanse los procedimientos y los procedimientos complementarios en [3]. Se realizaron por lo menos tres experimentos independientes para todos los análisis.

Cultivo celular

Las líneas celulares de CPCNP H1650, H1975, H2030, H2347, H2444, H358 y H1734 se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, Virginia, Estados Unidos). H3255 fue un obsequio de B. Johnson y P. Janne. Las células se cultivaron en medio de cultivo completo (RPMI-1640; Colección Americana de Cultivos Tipo n.º de catálogo 30-2001) complementado con suero fetal bovino al 10 %, 10 unidades/ml de penicilina y 10 [µ]g/ml de estreptomycin a 37 °C y CO₂ al 5 %. Para los estudios de viabilidad, las células se sembraron en medio de cultivo completo en placas ViewPlates de 96 pocillos negras con fondo transparente (PerkinElmer, Wellesley, Massachusetts, Estados Unidos) a una densidad de 5.000 (H1975 y H2030) o de 7.500 (H3255) células por pocillo. Después de la incubación durante una noche, las células se cultivaron durante 24 h en el medio RPMI-1640 complementado con suero al 0,1 %. Las células (en medio RPMI-1640 complementado que contenía suero al 0,1 %) se incubaron después durante 48 h con la presencia continua de gefitinib o erlotinib.

Ensayo de viabilidad

La viabilidad celular se ensayó utilizando calceína AM (éster de acetoximetilo de Calceína, Molecular Probes, Eugene, Oregón, Estados Unidos). Después de la incubación con gefitinib o erlotinib, se lavaron dos veces las monocapas con PBS (que contenía calcio y magnesio) y se incubaron con Calceína AM 7,5 [µ]mol en RPMI-1640 complementado (sin suero) durante 30 min. El medio de marcaje se retiró, y las células se lavaron tres veces con PBS. La fluoresceína de la calceína (Ex, 485 nm; Em 535 nm) se detectó de forma inmediata utilizando un lector de placa de multi-marcador Victor V (PerkinElmer); se realizaron tres experimentos independientes para cada línea celular; cada experimento incluyó de cuatro a ocho repeticiones por condición.

Producción de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-EGFR mutante

Se inyectó un grupo de tres ratones hembra Balb/c (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Mass.) con 5 µg/dosis de proteína EGFR truncada purificada o un fragmento de la misma que contenía la mutación T790M en 100 µl de adyuvante Detox (RIBI ImmunoChem Res Inc, Hamilton, Mo.) mediante inyección intraperitoneal en los días 0, 3, 7, 10 y 14. El día 17 los animales se sacrificaron, se retiraron sus bazos y los linfocitos se fusionaron con la línea de mieloma de ratón 653 utilizando polietilenglicol 4000 al 50 % mediante un procedimiento establecido (véanse las Patentes de Estados Unidos n.º 5.939.269 y 5.658.791, incorporadas como referencia en el presente documento). Las células fusionadas se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo seguido de selección por HAT en el día 1 después de la fusión. Después se hicieron reaccionar los sobrenadantes de cultivo de hibridoma inmovilizados con el mutante T790M del EGFR biotinilado. Los pocillos positivos para los anticuerpos anti-EGFR se expandieron para estudios adicionales. Estos cultivos permanecen estables cuando se expanden y las líneas celulares se conservan mediante congelación. Se determinó el isotipo de los cultivos parentales y después se ensayó su capacidad para capturar y para reconocer de forma específica el mutante T790M del EGFR.

Como alternativa, se generó un antisuero policlonal en conejo frente a péptidos de la proteína mutante purificados. Los anticuerpos policlonales frente al mutante T790M del EGFR se obtuvieron acoplado tales péptidos a hemocianina de lapa californiana con glutaraldehído al 0,05 %, se emulsionaron con adyuvante completo de Freund y se inyectaron por vía intradérmica en varios sitios. Los animales se reinmunizaron cuatro y siete semanas más tarde con el péptido acoplado emulsionado en adyuvante incompleto de Freund y se les extrajo sangre diez días después de la última inyección.

Los anticuerpos preparados de acuerdo con los procedimientos anteriores se usaron después para la identificación y/o el diagnóstico de células tumorales (es decir, en secciones ultrafinas de tejidos cancerosos) por la expresión de la mutación T790M del EGFR y/o para los enfoques terapéuticos de acuerdo con los procedimientos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.601.989, 5.563.247, 5.610.276 y 5.405.941. Estos mismos anticuerpos se utilizaron para controlar la expresión del mutante T790M del EGFR.

Ejemplo 1.

Para confirmar la presencia de la mutación T790M del EGFR, se realizó un ensayo basado en PCR de oligonucleótido específico de alelo (Guo, Z., Liu, Q. y Smith, L. M. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms by artificial mismatch hybridization. Nat. Biotechnol. 15, 331-335 (1997)), amplificando el alelo mutante utilizando cebadores de PCR con falta de coincidencia de una base que contenían un extremo 3' y un resto 3-nitropirrol. Los productos de PCR se crearon con un cebador específico de alelo mutante 3'

(5<1> CACCGTGCAGCTCATCAT S' (SEQ ID NO: 12) o
5' CGAAGGGCATGAGCTGCG 3' (SEQ ID NO: 13))

que contenía el complemento para la base mutante en el extremo 3' y un resto 3-nitropirrol cadena arriba del extremo 3'. El cebador específico de alelo mutante era capaz de amplificar ADN mutante obtenido de tumores congelados o incluidos en parafina, pero no era capaz de producir un producto a partir ADN normal. Al mismo tiempo, un cebador 3' de tipo silvestre (TS)

(5<1> CACCGTGCAGCTCATCAC 3' (SEQ ID NO: 14) o
5' CGAAGGGCATGAGCTGCA 3' (SEQ ID NO:15))

era capaz de amplificar sólo ADN de tipo silvestre normal pero no ADN mutante. Estos experimentos muestran que el alelo mutante se amplifica en muestras tumorales, mientras que no se amplifica en tejidos adyacentes normales.

Ejemplo 2. Origen clonal de la mutación T790M del EGFR

Cuando se realiza la microdissección cuidadosa del tumor en un intento de aumentar el porcentaje relativo de células tumorales en cualquier muestra dada, la proporción de los alelos T:C aumenta proporcionalmente. La PCR se realiza con uno de los cebadores descritos en el Ejemplo 1 y otro cebador que amplifica en el sentido contrario, de forma que puede obtenerse un fragmento fácilmente detectable para la secuencia del EGFR, ya sea mutado o de tipo silvestre, cuya presencia se busca. Los expertos en la materia pueden diseñar fácilmente la secuencia de tal cebador. Los resultados de tales procedimientos demuestran que la mutación T790M del EGFR es de origen clonal.

Ejemplo 3. Ensayo para la mutación T790M del EGFR en ADN genómico

Se proporciona un procedimiento para detectar la mutación T790M del EGFR mediante el cual se utiliza una enzima de restricción MAHI para reconocer la falta o la presencia del sitio de restricción en el codón mutado. En este Ejemplo se proporciona un ensayo que utiliza un cebador que cruza el límite intrón-exón para el exón 20. La detección basada en fluorescencia aprovecha un polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR (PCR-RFLP) generado por la mutación de sentido equívoco específica. La amplificación por PCR se realiza con los cebadores específicos para el exón-20 EGFR Ex20F (SEQ ID NO: 4) y EGFR Ex20R (SEQ ID NO: 5) (subrayados en la Tabla 4) que abarcan el nucleótido 2369. La Tabla 4 incluye una parte de la secuencia genómica más grande del intrón-exón del intrón 20 proporcionada en la Tabla 3 (SEQ ID NO: 3) desde la posición 161904 hasta la posición 162970. El extremo 3' del intrón cadena arriba del exón 20 se muestra en negrita.

Tabla 4.

....**gtatfttgaaactcaagatcgattcatggtcttcaggaaggggtccatgtgccctcctc**
tggccaecatgcaagccacactgacgtgcctctccctccctccaggaagcctacgtgatggccagcg
tggacaacccccacgtgtgccgcctgctgggcatctgcctcacctccacogtgcagctcatcacgag
ctcatgcccttcggctgcctcctggactatgtccgggaacacaaagacaatattggctcccagtacct
gctcaactggtgtgtgcagatcgcaaagg....

La secuencia de tipo silvestre contiene sitios para NlaTII específicos que, después de la digestión, producen un producto de 106 pb (véase Procedimientos; Figura 3A). La presencia del nucleótido 2369 T mutante crea un nuevo sitio de digestión de restricción principal, produciendo un producto ligeramente más corto (97 pb; Figura 3A), que se detecta fácilmente mediante electroforesis capilar fluorescente. Esta prueba es aproximadamente 2 veces más sensible que la secuenciación directa. Cualquier medio equivalente que escinda uno de los alelos 2369 (de tipo silvestre o mutante), pero no el otro, se considera útil en este ensayo de longitud de fragmento marcado. El ensayo necesita el uso de cualquier procedimiento conocido para incorporar un marcador en el amplicón de PCR de forma que los fragmentos resultantes sean detectables.

Ejemplo 4. Comunicaciones de casos

Los presentes inventores identificaron mutaciones del EGFR secundarias en tres de los seis individuos cuya enfermedad evolucionó con gefitinib o erlotinib (Tabla 5). A continuación, se presentan los historiales médicos abreviados de estos tres pacientes.

5 Paciente 1.

Esta mujer de 63 años que “nunca fumó” (fumó menos de 100 cigarrillos en toda su vida) inicialmente presentaba opacidades difusas bilaterales en el tórax y derrame pleural en el lado derecho. La biopsia transbronquial reveló adenocarcinoma. La enfermedad evolucionó en dos ciclos de quimioterapia sistémica, después de lo cual se inició gefitinib, 250 mg diarios. La comparación de las radiografías de tórax obtenidas antes del inicio de gefitinib (Figura 4A, panel izquierdo) y 2 semanas más tarde (Figura 4A, panel intermedio) mostró una mejora drástica. Nueve meses más tarde, una radiografía de tórax reveló evolución de la enfermedad (Figura 4A, panel derecho). Posteriormente, el paciente se sometió a una biopsia guiada por tomografía computarizada (TC) de un área en la base del pulmón derecho (Figura 5A, panel izquierdo). A pesar del tratamiento continuo con gefitinib, ya sea con quimioterapia o 500 mg diarios, el derrame pleural reapareció 12 meses después del inicio del tratamiento con gefitinib (Figura 5A, panel derecho). Se obtuvo líquido pleural para estudios moleculares. En total, para el análisis se disponía de tres muestras de ensayo tumorales de esta paciente: la biopsia del tumor de pulmón original, una biopsia de la lesión de pulmón en aumento y líquido pleural. Sin embargo, la revisión de la biopsia transbronquial original mostró que tenía escasas células tumorales (Tabla 5).

Paciente 2.

20 Esta mujer de 55 años con un historial de tabaquismo de nueve paquetes por año se sometió a dos resecciones quirúrgicas en 2 años (lobectomías superior derecha y superior izquierda) para carcinoma bronquioloalveolar con invasión focal. Dos años más tarde, su enfermedad reapareció con nódulos pulmonares bilaterales y adicionalmente evolucionó con quimioterapia sistémica. Después de eso, la paciente comenzó el tratamiento con erlotinib, 150 mg diarios. Un barrido de TC inicial del tórax demostró innumerables nódulos bilaterales (Figura 4B, panel izquierdo), que se redujeron claramente en número y tamaño 4 meses después del tratamiento (Figura 4B, panel intermedio). Después de 14 meses de terapia, la dosis del paciente de erlotinib se disminuyó hasta 100 mg diarios debido a la fatiga. A los 23 meses de tratamiento con erlotinib, un barrido de TC demostró una lesión esclerótica en aumento en la columna torácica. La paciente se sometió a biopsia guiada por TC de esta lesión (Figura 5B, panel izquierdo), y la dosis de erlotinib se aumentó hasta 150 mg diarios. Después de 25 meses de tratamiento, la enfermedad evolucionó en el pulmón (Figura 4B, panel derecho). El tratamiento con erlotinib se interrumpió y se realizó una biopsia con aguja gruesa guiada de forma fluoroscópica en un sitio de enfermedad evolutiva en el pulmón (Figura 5B, panel derecho). En total, para el análisis se disponía de tres muestras de ensayo tumorales de esta paciente: el tumor de pulmón reseccionado original, la biopsia de la lesión en aumento de la columna y la biopsia de la lesión de pulmón en evolución (Tabla 5).

35 Paciente 3.

Esta mujer de 55 años que “nunca fue fumadora” se trató durante casi 4,5 años con paclitaxel y trastuzumab de forma semanal [17] por un adenocarcinoma con características de carcinoma bronquioloalveolar que implicaba el lóbulo inferior izquierdo, la pleura y los ganglios linfáticos del mediastino. El tratamiento se interrumpió debido a la fatiga. Posteriormente, se sometió a la paciente a resección quirúrgica. Debido a la implicación metastásica de múltiples nódulos linfáticos del mediastino y las características clínicas conocidas en ese momento como predictivas de respuesta al gefitinib (mujer, nunca fumadora, histología variante bronquioloalveolar), se le puso 1 mes más tarde gefitinib “adyuvante” (Figura 4C, panel izquierdo). Este fármaco se interrumpió después de tres meses cuando la paciente desarrolló un nuevo derrame pleural maligno del lado derecho (Figura 4C, panel intermedio). A pesar del drenaje y de la quimioterapia sistémica, el derrame pleural reapareció 4 meses más tarde (Figura 4C, panel derecho), momento en el que se recogió líquido pleural para el análisis. En total, para el análisis se disponía de dos muestras de ensayo clínicas de esta paciente: tumor procedente de la resección quirúrgica y líquido pleural (Tabla 5).

Tabla 5. Muestras de ensayo analizadas en el presente estudio para mutaciones en el dominio tirosina quinasa del EFGF (Exones 18 a 24) y KRAS (Exón 2)

Paciente	Muestra de ensayo de Patología Analizada	Fecha de Obtención	Porcentaje de Células Tumorales	EGFR	KRAS
1	Biopsia transbronquial	Día 0	Escasas	Tipo silvestre	Tipo silvestre
	Lesión de pulmón en evolución	12 meses	>85 %	L858R + T790M	Tipo silvestre
	Derrame pleural	14 meses	>85 %	L858R + T790M	Tipo silvestre

(continuación)

Paciente	Muestra de ensayo de Patología Analizada	Fecha de Obtención	Porcentaje de Células Tumorales	EGFR	KRAS
2	Lesión de pulmón original	Día 0	>85 %	Del L747-E749; A750P	Tipo silvestre
	Lesión de la columna en evolución	75 meses	>85 %	Del L747-E749; A750P + T790M	Tipo silvestre
	Lesión de pulmón en evolución	77 meses	>85 %	Del L747-E749; A750P + T790M	Tipo silvestre
3	Biopsia pleural original	Día 0	n/a	Del E746-A750	Tipo silvestre
	Derrame pleural	76 meses	>50 %	Del E746-A750 + T790M	Tipo silvestre

La biopsia transbronquial en la paciente 1 tuvo escasas células tumorales; el análisis de secuenciación reveló solo secuencia de tipo silvestre (véase el texto). En otros tres casos, no se identificaron ninguna de las mutaciones de EGFR ni de KRAS adicionales (datos no mostrados). Porcentaje de células tumorales: definido mediante evaluación de los portaobjetos histopatológicas correspondientes, del: delección, n/a - no aplicable.

Ejemplo 5. Los tumores de las pacientes contienen mutaciones del dominio tirosina quinasa del EGFR asociadas con la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa del EGFR

5 Los presentes inventores exploraron todas las muestras tumorales disponibles procedentes de las tres pacientes descritas en el Ejemplo 4 para las mutaciones del EGFR sensibles a fármaco descritas anteriormente, mediante secuenciación directa del ADN de los exones 19 y 21 [3]. Las muestras tumorales de la paciente 1 mostraron un cambio T→G en el nucleótido 2573, que dio como resultado la sustitución de aminoácido L858R del exón 21 observada comúnmente en los tumores sensibles a fármaco. Esta mutación estaba presente en el material de biopsia de la lesión de pulmón en evolución (Figura 6A, paneles superiores; Tabla 5) y en células procedentes del derrame pleural (Figura 6A, paneles inferiores; Tabla 5), los cuales en el examen citopatológico consistían en una mayoría de células tumorales (Tabla 5). Cabe destacar que las comparaciones de los rastreos sugieren que puede haberse producido un aumento del número de copias del alelo mutante. En concreto, aunque la proporción de los picos de tipo silvestre (nucleótido T) con respecto al mutante (nucleótido G) en la posición 2573 fue de aproximadamente 1:1 o 1:2 en la muestra de ensayo de biopsia de pulmón (Figura 6A, paneles superiores), las células del líquido pleural demostraron un pico de G mutante dominante (Figura 6A, paneles inferiores). De forma concordante con esto, un polimorfismo mononucleotídico (PMN) observado en el nucleótido 2361 (A o G) demostró un cambio correspondiente en las proporciones de A:G, con una proporción de 1:1 en la biopsia transbronquial y una proporción casi de 5:1 en el líquido pleural (Figura 7A). Notablemente, los presentes inventores no detectaron la mutación T→G en 2573 en la muestra de ensayo de biopsia transbronquial original (Tabla 5; datos no mostrados). Como se indicó anteriormente, esta última muestra de ensayo contenía escasas células tumorales, muy probablemente menos que las necesarias para la detección de una mutación del EGFR mediante secuenciación directa (véase [7]).

25 Las tres muestras de ensayo de la paciente 2, que incluían el tumor de pulmón original y las dos muestras metastásicas de hueso y de pulmón, mostraron una delección del exón 19 que implicaba la eliminación de 11 nucleótidos (2238-2248) y la inserción de dos nucleótidos, G y C (Figura 6B, todos los paneles; Tabla 5). Estos cambios de nucleótidos suprimen los aminoácidos L747-E749 y cambian el aminoácido 750 de alanina a prolina (A750P). Previamente se había comunicado una mutación del L747-E749; A750P con distintos cambios de nucleótidos [2]. En todas las muestras de la paciente 2, la secuencia de tipo silvestre predominó en una proporción de aproximadamente 3:1 por encima de la secuencia mutante.

Las dos muestras tumorales disponibles de la paciente 3 contenían una delección de 15 nucleótidos (2236-2250) en el exón 19 (Tabla 5; datos no mostrados), que dio como resultado la eliminación de cinco aminoácidos (del E746-A750). Esta delección específica se había comunicado anteriormente [3]. La proporción de los picos de mutante con respecto al tipo silvestre fue de aproximadamente 1:1 en ambas muestras de ensayo (datos no mostrados).

35 En conjunto, estos resultados demuestran que los tumores procedentes de las tres pacientes contienen mutaciones del EGFR asociadas con la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa gefitinib y erlotinib. Además, estos datos muestran que, en pacientes individuales, las lesiones metastásicas o recurrentes de la columna vertebral, pulmones y líquido pleural contienen las mismas mutaciones. Estas últimas observaciones respaldan la idea de que las células tumorales recidivantes y metastásicas en los individuos derivan de clones progenitores originales.

40

Ejemplo 6. Una mutación de sentido equívoco secundaria en el dominio quinasa del EGFR detectada en lesiones que evolucionan durante el tratamiento con gefitinib o erlotinib

Para determinar si las mutaciones adicionales en el dominio quinasa del EGFR estaban asociadas con la evolución de la enfermedad en estas pacientes, los presentes inventores realizaron la secuenciación directa de todos los exones (18 hasta 24) que codifican la región catalítica del EGFR en las muestras de ensayo tumorales disponibles.

El análisis de la muestra de ensayo anterior al gefitinib de la paciente 1, que contenía escasas células tumorales (Tabla 5; véase anteriormente), sorprendentemente no solo mostró la secuencia del EGFR de tipo silvestre (Tabla 5; datos no mostrados). Sin embargo, el análisis meticuloso de los cromatogramas de secuencia del exón 20 en las direcciones directa e inversa de esta muestra de ensayo de biopsia de pulmón de la paciente obtenida después de la evolución de la enfermedad con tratamiento de gefitinib demostró un pequeño pico adicional en el nucleótido 2369, lo que sugiere una mutación C→T (Figura 7, paneles superiores; Tabla 5). Este cambio de nucleótido conduce a la sustitución de treonina por metionina en la posición 790 (T790M). El pico mutante C→T en 2369 fue incluso más prominente en las células procedentes del líquido pleural de la paciente, que se obtuvieron después de la evolución adicional de la enfermedad con tratamiento de gefitinib (Figura 7A, paneles inferiores; Tabla 5). El aumento de la proporción de picos de mutante con respecto al tipo silvestre obtenida de los análisis de la muestra de ensayo de pulmón y de fluido pleural fue en paralelo con el aumento en la proporción del pico de G mutante (que conduce a la mutación L858R) con respecto al pico de T de tipo silvestre en el nucleótido 2573 (véase anteriormente; Figura 6A), así como con el aumento de la proporción del PMN A:G en la posición 2361 (Figura 7A). En conjunto, estos hallazgos implican que la mutación T790M del exón 20 estaba presente en el mismo alelo que la mutación L858R del exón 21, y que un subclón de células que portaban estas mutaciones emergió durante el tratamiento con el fármaco.

En el paciente 2, la muestra rica en tumor obtenida antes del tratamiento con erlotinib no contenía ninguna de las mutaciones adicionales en los exones que codifican el dominio tirosina quinasa del EGFR (Figura 7B, paneles superiores; Tabla 5). En cambio, las lesiones óseas y de pulmón en evolución contenían un pequeño pico adicional en el nucleótido 2369, lo que sugería la existencia de un subclón de células tumorales con la misma mutación C→T observada en la paciente 1 (Figura 7B, paneles intermedios e inferiores; Tabla 5). Los tamaños relativos de los picos de la T mutante en 2369 vistos en estas últimas dos muestras parecían correlacionar con el tamaño relativo de los picos correspondientes de la delección del exón 19 (Figura 6B). Cabe destacar que el PMN en el nucleótido 2361 (A o G) se detectó en muestras de ensayo del paciente 2 antes pero no después del tratamiento con erlotinib, lo que sugirió que un alelo del EGFR experimentó amplificación o delección durante el transcurso del tratamiento (Figura 6B).

La paciente 3 mostró resultados análogos a los de la paciente 2. Una muestra de ensayo anterior al tratamiento rica en tumor no demostró mutaciones del EGFR distintas de la delección del exón 19 del E746-A750; en concreto, en el exón 20, no se detectaron cambios secundarios (Figura 7C, paneles superiores, Tabla 5). Sin embargo, el análisis del ADN procedente en el derrame pleural que se desarrolló después del tratamiento con gefitinib mostró la mutación C→T en el nucleótido 2369 en el exón 20 (Figura 7C, paneles inferiores; Tabla 5), correspondiente a la mutación T790M descrita anteriormente. No hubo cambio drástico entre las dos muestras en la proporción del PMN A:G en la posición 2361. El pico de la T mutante en 2369 fue pequeño, posiblemente debido a que el gefitinib se había interrumpido en esta paciente durante 4 meses, en el momento en el que se recogieron las células tumorales del líquido pleural; por lo tanto, no hubo ventaja selectiva conferida a las células que alojaban la mutación T790M.

Para determinar si la mutación C→T en 2369 era una mutación de EGFR encontrada en los CPCNP que se había pasado previamente por alto, los autores revisaron los rastreos de secuencia del exón 20 procedentes del análisis de 96 tumores extirpados frescos congelados [3] y 59 tumores incluidos en parafina [7], todos cuales se retiraron de los pacientes antes del tratamiento con un inhibidor de la tirosina quinasa de EGFR. Los presentes inventores no detectaron ninguna evidencia de la mutación T790M en estos 155 tumores (datos no mostrados). En conjunto, los resultados de los presentes inventores sugieren que la mutación T790M está asociada con lesiones que evolucionan durante el tratamiento con gefitinib o erlotinib. Además, por lo menos en los pacientes 1 y 2, los subclones de las células tumorales que portan esta mutación probablemente aparecieron entre el momento del tratamiento inicial con un inhibidor de la tirosina quinasa y la aparición de la resistencia al fármaco.

Además, después de la caracterización inicial de las tres pacientes con la mutación T790M descrita anteriormente con más detalle, se encontró que otros cuatro pacientes tenían la mutación T790M después de desarrollar resistencia a Iressa o Tarceva de un total de 13 pacientes que respondieron de forma inicial y después recayeron durante el tratamiento. La Tabla 6 resume los resultados (la tabla no incluye los datos procedentes del paciente que nunca respondió al tratamiento y que más tarde se encontró que tenía T790M):

Tabla 6.

Pt	Fármaco	Meses	Sitio	Momento de la biopsia	Mutación 1 ^a	Mutación 2 ^a
1	E	19	Columna vertebral/pulmón	26	Del	T790M
2	G	10	Líquido PI	10	Del	T790M
3	G	13	Pulmón	14	Del	T790M
4	G	11	Epiplón	12	Del	T790M
5	G	15	Pulmón/liq. peric.	16	Del	T790M
6	G	15	Pulmón	16	L858R	T790M
7	E	16	Pulmón	22	Del	Ninguna
8	G	11	Pulmón	13	Del	Ninguna
9	G	11	Líquido PI/ascitis	12	Del	Ninguna
10	G	19	Ascitis	23	Del	Ninguna
11	G	7	Cuello uterino	8	Del	Ninguna
12	G	12	GL Ing	16	Del	Ninguna
13	G	7	Pleura	9	Del	ninguna

En siete pacientes (historiales de casos no descritos en el presente documento) con adenocarcinomas de pulmón que mejoraron pero que posteriormente evolucionaron estando en terapia con gefitinib o erlotinib, los presentes inventores examinaron el ADN procedente de muestras de ensayo tumorales obtenidas durante la evolución de la enfermedad. En los siete pacientes, los presentes inventores encontraron mutaciones del EGFR asociadas con la sensibilidad a fármaco (todas deleciones del exón 19). Sin embargo, los presentes inventores no encontraron ninguna mutación adicional en los exones 18 a 24 del EGFR, incluyendo el cambio C→T en la posición 2369 (datos no mostrados). Estos resultados implican que existen mecanismos alternativos de adquisición de resistencia al fármaco.

Ejemplo 7. Los tumores progresivos de los pacientes carecen de mutaciones en KRAS

Las mutaciones en el exón 2 de KRAS se producen en aproximadamente un cuarto de los CPCNP. Tales mutaciones raramente, o nunca, acompañan a las mutaciones de EGFR y están asociadas con la resistencia primaria a gefitinib o erlotinib [7]. Para evaluar la posibilidad de que las mutaciones de KRAS secundarias confieran resistencia adquirida a estos fármacos, los presentes inventores realizaron un perfil mutacional del exón 2 de KRAS2 de muestras de ensayo tumorales de los pacientes 1 a 3, así como de los tres pacientes adicionales con falta de evidencia sobre la mutación T790M. Ninguna de las muestras de ensayo contenían ningún cambio en KRAS (Tabla 5; y datos no mostrados), lo que indica que las mutaciones de KRAS no fueron responsables de la resistencia al fármaco y la evolución del tumor en estos seis pacientes.

Ejemplo 8. Una línea celular establecida de CPCNP también contiene tanto la mutación T790M como la mutación L858R

Los presentes inventores realizaron el perfil del dominio tirosina quinasa del EGFR (exones 18 a 24) y el exón 2 de KRAS en ocho líneas establecidas de CPCNP (Tabla 7). Cabe destacar que una línea celular - H1975 - contenía la misma mutación C→T en la posición 2369 (T790M) como se describe anteriormente (Figura 7D, panel inferior). Otros autores habían mostrado previamente que esta línea celular contiene una mutación T→G en 2573 en el exón 21 (L858R) [18], lo cual confirmaron los presentes inventores (Figura 7D, panel superior); además, se comunicó que H1975 es más sensible a la inhibición por gefitinib que otras líneas celulares de cáncer de pulmón que portan el EGFR de tipo silvestre [18]. Aparentemente, en este estudio publicado solo se examinaron los exones 19 y 21.

Tabla 7. Estado de las líneas celulares de CPCNP analizadas para las mutaciones del dominio tirosina quinasa del EGFR (exones 18 a 24) y KRAS (exón 2)

Línea celular	EGFR	KRAS
H1650	Del E746-A750	Tipo silvestre
H3255	L858R	Tipo silvestre
H1975	L858R + T790M	Tipo silvestre
H2030	Tipo silvestre	G12C
H358	Tipo silvestre	G12C
H2444	Tipo silvestre	G12V
H1734	Tipo silvestre	G13C
H2347	Tipo silvestre	L19F

del: delección. Véanse los procedimientos para detalles adicionales.

5 En el análisis de H1975 de los presentes inventores (exones 18 a 24), el pico de la T mutante en 2369 que da como resultado la sustitución de aminoácido T790M era dominante, lo que sugiere un aumento del número de copias del alelo mutante en comparación con el alelo de tipo silvestre. La proporción de picos mutantes con respecto al tipo silvestre fue similar a la de los picos de la G mutante 2573 (que corresponde a la sustitución de aminoácido L858R) con respecto a la T de tipo silvestre (Figura 7D, todos los paneles), lo que implica que las mutaciones T790M y L858R estaban en el mismo alelo amplificado. Para investigar adicionalmente esta posibilidad, los presentes inventores realizaron RT-PCR para generar los ADNc que se extienden a lo largo del exón 20 del EGFR e incluyen secuencias de los exones 19 y 21. Después, los productos de PCR se clonaron y se analizaron las mutaciones del EGFR en las colonias individuales. Los cromatogramas de secuenciación de ADN procedente de cuatro clones mostraron ambas mutaciones, C→T en 2369 y T→G en 2573, lo que confirma que ambas mutaciones estaban en el mismo alelo (dato no mostrado).

15 Otras líneas celulares de CPCNP portaban mutaciones en EGFR o KRAS, pero ninguna tenía ambas (Tabla 7). Como se comunicó, H3255 contenía una mutación L858R [19] y H1650 contenía una delección del exón 19 [18]. Ninguna otra línea celular analizada contenía mutaciones adicionales en los exones que codifican el dominio tirosina quinasa del EGFR.

20 **Ejemplo 9. Un ensayo de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR nuevo confirma de forma independiente la ausencia o presencia de la mutación T790M**

25 Como se ha indicado anteriormente, los picos mutantes que sugieren una mutación T790M en el exón 20 eran pequeños en algunos cromatogramas de secuencia. Para eliminar la posibilidad de que estos picos se debieran a las “interferencias” de fondo, los presentes inventores buscaron confirmar la presencia de la mutación C→T en 2369 en muestras específicas, desarrollando una prueba independiente, basada en un ensayo de detección por fluorescencia que aprovecha un polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de PCR (PCR-RFLP) generado mediante una mutación de sentido equívoco específica. Después de la amplificación por PCR con los cebadores específicos del exón 20 que abarcan el nucleótido 2369, la secuencia de tipo silvestre contiene sitios NlaIII específicos que, después de la digestión, producen un producto de 106 pb (véanse los Procedimientos; Figura 3a). La presencia del nucleótido T mutante en 2369 crea un nuevo sitio de digestión de restricción principal, produciendo un producto ligeramente más corto (97 pb), detectado fácilmente mediante electroforesis capilar de fluorescencia. Esta prueba es aproximadamente 2 veces más sensible que la secuenciación directa (véanse los Procedimientos; datos no mostrados).

35 Los presentes inventores en primer lugar utilizaron ADN procedente de la línea celular HI 975 (que contiene ambas mutaciones, T790M y L858R) para confirmar la especificidad del ensayo PCR-RFLP. Como se esperaba, el análisis de estas células produjo ambos fragmentos de 97 y 106 pb. En cambio, el análisis del ADN procedente de H2030 (que contiene el EGFR de tipo silvestre; Tabla 7) mostró solo el fragmento de 106 pb (Figura 3A). Estos datos muestran que esta prueba puede indicar fácilmente la ausencia o presencia del alelo mutante en las muestras de ADN. Sin embargo, esta prueba solo fue semicuantitativa, dado que la proporción del producto mutante de 97 pb frente al producto de tipo silvestre de 106 pb varió en experimentos independientes de aproximadamente 1:1 a 2:1.

40 A continuación, los autores utilizaron este ensayo de PCR-RFLP para evaluar la presencia de la mutación C→T en 2369 específica que corresponde a la sustitución de aminoácido T790M en diversas muestras de pacientes. El ADN

procedente de lesiones óseas y de pulmón en evolución del paciente 1 produjo ambos fragmentos de 97 y 106 pb, pero el ADN procedente del tumor de pulmón original no lo hizo (Figura 3B). La proporción de los productos mutante con respecto al tipo silvestre fue mayor en las células del líquido pleural, lo que es coherente con los picos mayores vistos en los cromatogramas de la secuenciación directa del exón 20 (véase la Figura 7A). Así mismo, el ADN procedente de lesiones en evolución de los pacientes 2 y 3 produjo ambos fragmentos de 97 y 106 pb en el ensayo de PCR-RFLP (Figura 3B), mientras que las muestras de ensayo del pretratamiento no produjeron el producto 97 pb. En conjunto, estos datos procedentes de un ensayo independiente confirman que la mutación T790M estaba presente en las lesiones en evolución de los tres pacientes. Además, los presentes inventores fueron incapaces de detectar la mutación T790M en ninguna de las muestras de ensayo procedentes de los tres pacientes adicionales con resistencia adquirida que fracasaron en demostrar las mutaciones secundarias en los exones 18 a 24 del EGFR mediante secuenciación directa (datos no mostrados).

Ejemplo 10. Propiedades bioquímicas de los mutantes de EGFR

Para determinar como la mutación T790M afectaría a las proteínas EGFR que contienen ya las mutaciones asociadas con la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa del EGFR, los presentes inventores introdujeron la mutación específica en los ADNc del EGFR que codifican las mutaciones de los exones 21 y 19 encontradas en los pacientes 1 y 2, respectivamente. Después, se produjeron las proteínas correspondientes ([i] L858R y L858R más T790M, [ii] del L747-E749; A750P y del L747-E749; A750P más T790M, y [iii] EGFR de tipo silvestre y EGFR de tipo silvestre más T790M) mediante transfección transitoria con vectores de expresión en células 293T, que tienen niveles muy bajos de EGFR endógeno [3]. Se analizaron mediante inmunotransferencia diversos lisados de células que se privaron de suero y pretrataron con gefitinib o erlotinib. Las cantidades del EGFR totales (t-EGFR) se determinaron utilizando un anticuerpo monoclonal anti-EGFR, y la actina sirvió como un indicador de los niveles relativos de proteína por muestra. Para evaluar la sensibilidad a fármaco de las diversas quinasas del EGFR en ensayos alternativos, los presentes inventores utilizaron un anticuerpo específico de fosfato Y1092 (es decir, fosfo-EGFR [p-EGFR]) para medir los niveles de Tyr-1092 "autofosforilada" en EGFR en relación a los niveles de la proteína t-EGFR. Los presentes inventores también evaluaron el patrón global y los niveles de la fosforilación de tirosina inducida de las proteínas celulares utilizando un reactivo anti-fosfotirosina generalizado (RC-20).

El gefitinib inhibió la actividad de los EGFR de tipo silvestre y L858R de forma progresiva con concentraciones crecientes de fármaco, como se demuestra por una reducción de las proteínas fosforiladas en tirosina (Figura 8A) y una disminución de las proporciones p-EGFR:t-EGFR (Figura 8B). Por el contrario, los EGFR de tipo silvestre y mutante que contenían la mutación T790M no presentaron un cambio significativo en las proporciones de inducción de tirosina fosforilada o de p-EGFR:t-EGFR (Figura 8A y 8B). Se obtuvieron resultados similares utilizando erlotinib frente a los EGFR de tipo silvestre y del E747-L747; A750P en comparación con los mutantes correspondientes que contenían la mutación T790M (Figura 8C). Estos resultados sugieren que la mutación T790M puede afectar negativamente a la capacidad de gefitinib o erlotinib para inhibir la actividad tirosina quinasa del EGFR, incluso en los mutantes del EGFR (es decir, L858R o una deleción del exón 19) que están clínicamente asociados con la sensibilidad a fármaco.

Ejemplo 11. Resistencia a gefitinib o erlotinib de una línea celular de CPCNP que porta tanto la mutación T790M como la mutación L858R

Para explorar adicionalmente las consecuencias funcionales de la mutación T790M, los presentes inventores determinaron la sensibilidad de diversas líneas celulares de CPCNP cultivadas en presencia de gefitinib o erlotinib, utilizando un ensayo basado en calceína AM. La captación o retención de este sustrato de la esterasa fluorogénico por células vivas tratadas con vehículo frente a las tratadas con fármaco permite una comparación de la viabilidad celular relativa entre líneas celulares [20]. La línea celular H3255, que porta la mutación L858R y no porta otras mutaciones del dominio TK del EGFR (Tabla 7), fue sensible al tratamiento con gefitinib, con una CI_{50} de aproximadamente 0,01 μ mol (Figura 9). En cambio, la línea celular H1975, que contiene ambas mutaciones L858R y T790M (Tabla 7), era aproximadamente 100 veces menos sensible al fármaco, con una CI_{50} de aproximadamente 1 μ mol (Figura 9). De hecho, la sensibilidad de las células H1975 fue más similar a la de H2030, que contiene el EGFR de tipo silvestre (exones 18 a 24) y KRAS mutante (Figura 9). Se obtuvieron resultados muy similares con erlotinib (Figura 10).

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, y col. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139.
2. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, y col. (2004) EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497-1500.
3. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, y col. (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13306-13311.
4. Huang SF, Liu HP, Li LH, Ku YC, Fu YN, y col. (2004) High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res* 10: 8195-8203.
5. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, y col. (2004) Mutations of the epidermal growth factor

receptor gene in lung cancer: Biological and clinical implications. *Cancer Res* 64: 8919-8923.

6. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, y col. (2004) Clinical and biological features of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* En prensa.
7. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, y col. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* 2: e17.
8. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ (2004) The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*: Epub antes de la impresión.
9. Al-Ali HK, Heinrich MC, Lange T, Krahl R, Mueller M, y col. (2004) High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol J* 5: 55-60.
10. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, y col. (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293: 876-880.
11. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, y col. (2002) Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2: 117-125.
12. O'Hare T, Pollock R, Stoffregen EP, Keats JA, Abdullah OM, y col. (2004) Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: Implications for CML. *Blood* 104: 2532-2539.
13. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, y col. (2004) Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 305: 399-401.
14. Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* 432: 294-297.
15. Tamborini E, Bonadiman L, Greco A, Albertini V, Negri T, y col. (2004) A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* 127: 294-299.
16. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, y col. (2003) A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FJJP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348: 1201-1214.
17. Krug LM, Miller VA, Crapanzano J, Ng KK, Pizzo B, y col. (2001) Randomized phase II trial of trastuzumab (tras) plus either weekly docetaxel (doc) or paclitaxel (pac) in previously untreated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 20: 1328.
18. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J (2004) Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305: 1163-1167.
19. Tracy S, Mukohara T, Hansen M, Meyerson M, Johnson BE, y col. (2004) Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small cell lung cancer cell line H3255. *Cancer Res* 64: 7241-7244.
20. Bozyczko-Coyne D, McKenna BW, Connors TJ, Neff NT (1993) A rapid fluorometric assay to measure neuronal survival in vitro. *J Neuroscience Meth* 50: 205-216.
21. Blencke S, Zech B, Engkvist O, Greff Z, Orfi L, y col. (2004) Characterization of a conserved structural determinant controlling protein kinase sensitivity to selective inhibitors. *Chem Biol* 11: 691-701.
22. Blencke S, Ullrich A, Daub H (2003) Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* 278: 15435-15440.
23. Kreuzer KA, Le Coutre P, Landt O, Na IK, Schwarz M, y col. (2003) Preexistence and evolution of imatinib mesylate-resistant clones in chronic myelogenous leukemia detected by a PNA-based PCR clamping technique. *Ann Hematol* 82: 284-289.
24. Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C (2002) Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* 277: 46265-46272.
25. Daub H, Specht K, Ullrich A (2004) Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 3: 1001-1010.
26. Wood ER, Truesdale AT, McDonald OB, Yuan D, Hassell A, y col. (2004) A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): Relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* 64: 6652-6659.
27. Chen LL, Trent JC, Wu EF, Fuller GN, Ramdas L, y col. (2004) A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 64: 5913-5919.
28. Gorre ME, Sawyers CL (2002) Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 9: 303-307.
29. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, y col. (2005) EGFR Mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23: 857-865.
30. Russom A, Tooke N, Andersson H, Stemme G (2003) Single nucleotide polymorphism analysis by allele-specific primer extension with real-time bioluminescence detection in a microfluidic device. *J Chromatog A* 1014: 37-45.
31. Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvanen AC (2000) A system for Specific, High-throughput Genotyping by allele-specific primer extension on Microarrays. *Genome Res* 10: 1031-1042.
32. Ugozzoli L, Wahlqvist JM, Ehsani A, Kaplan BE, Wallace RB (1992) Detection of specific alleles by using allele-specific primer extension followed by capture on solid support. *GATA (Genetic Anal: Biomol Eng)* 9: 107-

112.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Memorial Sloan Kettering Cancer Center Varmus, Harold Politi, Katerina Pao, William Miller, Vincent

<120> Procedimientos y composiciones para la detección de un mutante de EGFR resistente a fármacos

<130> 402-04

10 <150> US60/652.488

<151> 11-02-2005

<160> 15

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

15

<210> 1

<211> 3633

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

atgcgacct	ccgggacggc	cggggcagcg	ctcctggcgc	tgetggetgc	getctgcccg	60
gcgagtcggg	ctctggagga	aaagaaagt	tgccaaggca	cgagtaacaa	gctcacgcag	120
ttgggcactt	ttgaagatca	ttttctcagc	ctccagagga	tgttcaataa	ctgtgaggtg	180
gtccttggga	atthggaaat	tacctatgtg	cagaggaatt	atgatctttc	cttcttaaag	240
accatccagg	aggtggctgg	ttatgtcctc	attgcctca	acacagtggg	gcgaattcct	300
ttggaaaacc	tcagatcat	cagaggaaat	atgtactacg	aaaattccta	tccttagca	360
gtcttatcta	actatgatgc	aaataaaacc	ggactgaagg	agctgcccat	gagaaattta	420
caggaaatcc	tcgatggcgc	cgtgcggttc	agcaacaacc	ctgccctgtg	caacgtggag	480
agcatccagt	ggcgggacat	agtcagcagt	gactttctca	gcaacatgtc	gatggacttc	540
cagaaccacc	tgggcagctg	ccaaaagtgt	gatccaagct	gtcccaatgg	gagctgctgg	600
ggtgcaggag	aggagaactg	ccagaaaactg	acaaaaatca	tctgtgcca	gcagtgtctc	660
gggcgctgcc	gtggcaagtc	ccccagtgc	tgetgccaca	accagtgtgc	tcaggctgc	720
acaggccccc	gggagagcga	ctgectggtc	tgccgcaaat	tccgagacga	agccacgtgc	780
aaggacacct	gccccccact	catgtctctc	aaccaccaca	cgtaccagat	ggatgtgaac	840
cccgagggca	aatacagctt	tgtgtccacc	tgcgtgaaga	agtgtccccg	taattatgtg	900
gtgacagatc	acggctcgtg	cgtccgagcc	tgtggggccg	acagctatga	gatggaggaa	960
gacggcgtcc	gcaagtgtaa	gaagtgcgaa	ggccttgccc	gcaaagtgtg	taacggaata	1020
ggtattggtg	aatttaaaga	ctcactctcc	ataaatgcta	cgaatattaa	acacttcaaa	1080
aactgcacct	ccatcagtg	cgatctccac	atcctgccc	tggcatttag	gggtgactcc	1140
ttcacacata	ctcctcctct	ggatccacag	gaactggata	ttctgaaaac	cgtaaaggaa	1200
atcacagggt	ttttgctgat	tcaggcttgg	cctgaaaaca	ggacggacct	ccatgccttt	1260
gagaacctag	aatcatac	cggcaggacc	aagcaacatg	gtcagttttc	tcttgcatgc	1320
gtcagcctga	acataacatc	cttgggatta	cgctccctca	aggagataag	tgatggagat	1380
gtgataattt	caggaaacaa	aaatttgtgc	tatgcaaata	caataaactg	gaaaaaactg	1440
tttgggacct	ccggtcagaa	aaccaaaatt	ataagcaaca	gaggtgaaaa	cagctgcaag	1500
gccacaggcc	aggtctgcca	tgccttgtgc	tccccgagg	gctgctgggg	cccggagccc	1560
agggactg	tctcttgccg	gaatgtcagc	cgaggcaggg	aatgctgga	caagtgcaac	1620
cttctggagg	gtgagccaag	ggagtttgtg	gagaactctg	agtgcataca	gtgccacca	1680
gagtgcctgc	ctcaggccat	gaacatcacc	tgcaacagg	ggggaccaga	caactgtatc	1740
cagtgtgccc	actacattga	cggccccac	tgcgtcaaga	cctgcccggc	aggagtcatg	1800
ggagaaaaca	acaccctggt	ctggaagtac	gcagacgccg	gccatgtgtg	ccacctgtgc	1860
catccaaact	gcacctacgg	atgcaactgg	ccaggtcttg	aaggctgtcc	aacgaatggg	1920
cctaagatcc	cgtccatcgc	cactgggatg	gtgggggccc	tcctcttgct	gctggtggtg	1980

ES 2 586 410 T3

```

gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cggcacatcg ttcggaagcg cagcgtgcgg 2040
aggctgctgc aggagagggg gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100
caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160
ggtgogttcg gcacgggtga taagggactc tggatcccag aaggtgagaa agttaaaatt 2220
cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgcct gctgggcate 2340
tgctcacct ccaccgtgca gctcattacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400
tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgetcaactg gtgtgtgcag 2460
atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtegtttgg tgcaccgcga cctggcagcc 2520
aggaacgtac tggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa 2580
ctgctgggtg cgaagagaaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640
atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
ggggtgaccg tttgggagtt gatgaccttt ggatccaagc catatgaocg aatccctgcc 2760
agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc 2820
atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgcccaaag 2880
ttcgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccag acccccagcg ctaccttgtc 2940
attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtaoct catcccacag 3060
cagggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tectgagctc tctgagtgca 3120
accgaaaca attccaccgt ggcttgcatc gatagaaatg ggctgcaaag ctgtccatc 3180
aaggaaagca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac 3240
agcatagacg acaccttctt cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg 3300
cccgtgget ctgtgcagaa tctgtctat cacaatcagc ctctgaacct ogcgcaccagc 3360
agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccga gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgccactg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600
gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

```

<210> 2
 <211> 1204
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

```

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1          5          10          15
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20          25          30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35          40          45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50          55          60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65          70          75          80
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85          90          95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100         105         110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115         120         125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130         135         140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145         150         155         160
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165         170         175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180         185         190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195         200         205

```

10

ES 2 586 410 T3

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
 210 215 220
 Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255
 Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335
 Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350
 Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365
 Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
 370 375 380
 Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
 385 390 395 400
 Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
 405 410 415
 Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Lys Leu Leu Glu Gly
 530 535 540
 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560
 Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575
 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605
 Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620
 Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640
 Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655
 Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
 660 665 670
 Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
 675 680 685
 Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu

ES 2 586 410 T3

690						695					700						
Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ser		
705						710				715							720
Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu		
				725						730							735
Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser		
				740					745								750
Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Ser		
				755				760									765
Val	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser		
				770				775									780
Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Met	Gln	Leu	Met	Pro	Phe	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp		
785						790				795							800
Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asn		
				805						810							815
Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Asn	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Arg		
				820					825								830
Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Thr	Pro		
				835				840									845
Gln	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Ala		
				850				855									860
Glu	Glu	Lys	Glu	Tyr	His	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp		
865						870				875							880
Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	His	Arg	Ile	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp		
				885						890							895
Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ser		
				900					905								910
Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Glu	Ile	Ser	Ser	Ile	Leu	Glu		
				915				920									925
Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr		
				930				935									940
Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	Ala	Asp	Ser	Arg	Pro	Lys		
945						950				955							960
Phe	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln		
				965						970							975
Arg	Tyr	Leu	Val	Ile	Gln	Gly	Asp	Glu	Arg	Met	His	Leu	Pro	Ser	Pro		
				980					985								990
Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Met	Asp		
				995				1000									1005
Asp	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe		
				1010				1015									1020
Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala		
1025						1030					1035						1040
Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Ile	Asp	Arg	Asn	Gly	Leu	Gln		
				1045							1050						1055
Ser	Cys	Pro	Ile	Lys	Glu	Asp	Ser	Phe	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asp		
				1060						1065							1070
Pro	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Ser	Ile	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	Pro		
				1075					1080								1085
Val	Pro	Glu	Tyr	Ile	Asn	Gln	Ser	Val	Pro	Lys	Arg	Pro	Ala	Gly	Ser		
				1090				1095									1100
Val	Gln	Asn	Pro	Val	Tyr	His	Asn	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Ser		
1105						1110											1120
Arg	Asp	Pro	His	Tyr	Gln	Asp	Pro	His	Ser	Thr	Ala	Val	Gly	Asn	Pro		
				1125						1130							1135
Glu	Tyr	Leu	Asn	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Phe	Asp		
				1140						1145							1150
Ser	Pro	Ala	His	Trp	Ala	Gln	Lys	Gly	Ser	His	Gln	Ile	Ser	Leu	Asp		
				1155					1160								1165
Asn	Pro	Asp	Tyr	Gln	Gln	Asp	Phe	Phe	Pro	Lys	Glu	Ala	Lys	Pro	Asn		
				1170					1175								1180

ES 2 586 410 T3

Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val
 1185 1190 1195 1200
 Ala Pro Gln Ser

5 <210> 3
 <211> 2160
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> gen
 <222> (161101)..(163260)

<400>3

```

tttagcttcc tcagcccaag aatagcagaa gggttaaaat aaagtctgta tttatggctc      60
tgtcaaagga aggcccttgc cttggcagcc agccggaatt agcagggcag cagatgcctg      120
actcagtgca gcatggattt cccatagggg gcttgggggg acagcacaga gagaccactt      180
ctctttagaa atgggtcccg ggagccagg cagccttttag tcaactgtaga ttgaatgctc      240
tgtccatttc aaaacctggg actggtctat tgaagagct tatccagcta ctctttgcag      300
aggtgctgtg ggcaggttcc ccagccaaa tgcccaccca tttcccagag cacagtcagg      360
gccaagcctg gcctgtgggg aaggaggcc tttctccctg ctggctcggg gctccccgga      420
tgcttctctc atcgttgtc ctctgcagca cccacagcca gcgttctga tgtgcagggt      480
cagtcattac ccaggggtgtt ccggaaccca cacagattcc tacaggccct catgatattt      540
taaaacacag catcctcaac cttgaggcgg aggtcttcat aacaaagata ctatcagttc      600
ccaaactcag agatcaggtg actccgactc ctcttttate caatgtgctc ctcatggcca      660
ctgttgccctg ggctctctg tcatggggaa tcccagatg caccaggag gggccctctc      720
ccactgcattc tgtcacttca cagccctcgg taaacgtccc tgtgctaggt cttttgcagg      780
cacagctttt cctccatgag tacgtatttt gaaactcaag atcgcattca tgcgtcttca      840
cctggaaggg gtccatgtgc cctccttctt gccaccatg cgaagccaca ctgacgtgcc      900
tctccctccc tccaggaagc ctacgtgatg gccagcgtgg acaaccccca cgtgtgccgc      960
ctgctgggca tetgctcacc ctccaccgtg cagctcatca cgcagctcat gcccttcggc     1020
tgctcctgg actatgtccg ggaacacaaa gacaatattg gctcccagta cctgctcaac     1080
tgggtgtgtc agatcgcaaa ggtaatcagg gaagggagat acggggaggg gagataagga     1140
gccaggatcc tcacatgcgg tctgcctccc tgggatagca agagtttgcc atggggatat     1200
gtgtgtgctg gcatgcagca cacacacatt cctttatttt ggattcaate aagttgatct     1260
tcttgtgcac aaatcagtgc ctgtcccatc tgcattgtga aactctcacc aatcagctac     1320
ctttgaagaa ttttctcttt attgagtgtc cagtgtgggc tgatgtctct gttcttattt     1380
ctctggaatt ctttgtgaat actgtggtga tttgtagtgg agaaggaata ttgcttcccc     1440
cattcaggac ttgataacaa ggtaagcaag ccaggccaag gccaggagga cccagggtgat     1500
agtgggtggg tggagcaggt gccttcagag aggeccagtg aggaggtgca aggagctgac     1560
agagggcgca gctgctgctg ctatgtggct ggggccttgg ctaagtgtcc cctttccac     1620
aggctcgtc cagagccagg gcggggctga gagagcagag tggtcaggta gccctgcctg     1680
gggtcctggg acaggcacag aacaacaagc caggtatttc acagctggtg cggaccocaga     1740
aagacttctg cttttgcccc aaaccctctc catctccatc ccagtcttgc atcagttatt     1800
tgcactcaac ttgctaagtc ctattttttt ctaacaatgg gtatacattt catcccattg     1860
actttaaagg atttgcaggc aggcctgtc tctgagaata cgcggttgc cgtcatctct     1920
ctccgacagc agggcagggg gtccagagat gtgccagggg ccagagggag ggagcagaca     1980
cccacccggc ctgggcaggt cctctcatt gcttgcatec gcctggttag cagtggcagt     2040
cagtcctgcc gactcattcg tgaggcgtc acccaactcc aggcagatgt aaaaggtgac     2100
ctacaagaag acaaacaaaa acatctggag cgctcttatg ccagcatctg cccttgacac     2160
    
```

15 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> *Homo sapiens*

<400>4

ES 2 586 410 T3

ctccctccag gaagcctacg tgat 24

5 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> *Homo sapiens*

<400> 5
ttgcatct gcacacacca 20

15 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> *Homo sapiens*

<400> 6
cccaaccaag ctctcttgag 20

25 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> *Homo sapiens*

35 <400> 7
atgacaaggt agcgtgggg g 21

40 <210> 8
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> *Homo sapiens*

<400> 8
taaaattccc gtcgctatca aggagccaac atctccgaaa gccaacaagg 50

50 <210> 9
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> *Homo sapiens*

<400> 9
ccttggtgc ttccggagat gttggctcct tgatagcgac ggaatttta 50

60 <210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> *Homo sapiens*

<400> 10

ES 2 586 410 T3

	agctcatcat gcagctcat	19
5	<210> 11 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 11 atgagctgca tgatgagct	19
15	<210> 12 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 12 caccgtgcag ctcatcat	18
30	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13 cgaagggcat gagctgcg	18
40	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14 caccgtgcag ctcatcac	18
50	<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 15 cgaagggcat gagctgca	18

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para la detección de una resistencia adquirida a los efectos terapéuticos de gefitinib o erlotinib en un sujeto que padece, o se sospecha que tiene, cáncer de pulmón, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar una muestra que se ha obtenido del sujeto, y
b) sondar la muestra con un medio para detectar de forma selectiva una secuencia de nucleótidos que comprende una T mutante en la posición que corresponde a la base 2369 del ADNc del EGFR (SEQ ID No: 1);
c) identificar que la base en dicha posición es T;

10 en el que encontrar que la forma mutante está presente indica que el cáncer está desarrollando resistencia adquirida a los efectos terapéuticos de gefitinib o erlotinib, en el que el paciente ha sido tratado con gefitinib o erlotinib antes de que la muestra se haya obtenido del paciente, y el paciente era sensible a gefitinib o erlotinib cuando se administró por primera vez.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer porta una mutación somática de ganancia de función en el dominio tirosina quinasa del EGFR que hace que el cáncer sea sensible a gefitinib o erlotinib.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la mutación somática de ganancia de función es L858R.

5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la mutación somática de ganancia de función es una delección de la secuencia de aminoácidos Leu-Arg-Glu-Ala del exón 19 del EGFR.

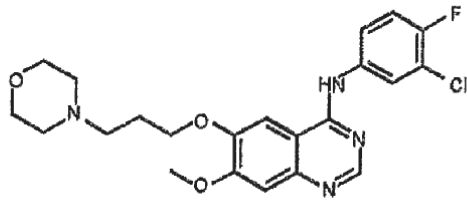
6. El procedimiento descrito en la reivindicación 1 en el que el sondeo comprende

- 20 a) si es necesario, tratar la muestra para liberar los ácidos nucleicos contenidos en la misma;
b) poner en contacto los ácidos nucleicos obtenidos a partir de la muestra con una composición que comprende un par cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que hibridan en condiciones adecuadas de PCR con un polinucleótido que codifica un polipéptido de EGFR, en el que el par de cebadores engloba la
25 c) llevar a cabo una reacción de PCR en la mezcla para proporcionar un amplicón de PCR que comprende la posición correspondiente a la base 2369; y
d) poner en contacto el amplicón con un medio de escisión que escinde el amplicón ya sea

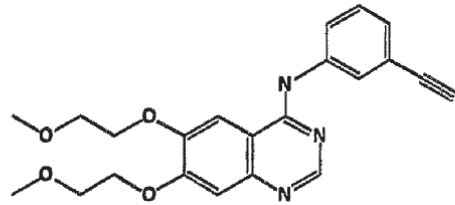
- 30 i) escindiendo un amplicón que tiene una T mutante en la posición que corresponde a la base 2369 dentro de 6 bases desde la posición, pero sin escindir un amplicón que tiene una C de tipo silvestre en la posición, o
ii) escindiendo un amplicón que tiene una C de tipo silvestre en la posición que corresponde a la base 2369 dentro de 6 bases desde la posición, pero sin escindir un amplicón que tiene una T mutante en la posición.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el par de cebadores incluye un cebador seleccionado entre las SEQ ID No. 4-7.

Figura 1



ZD1839; gefitinib
Iressa
AstraZeneca



OSI-774; erlotinib
Tarceva
Genentech

Figura 2

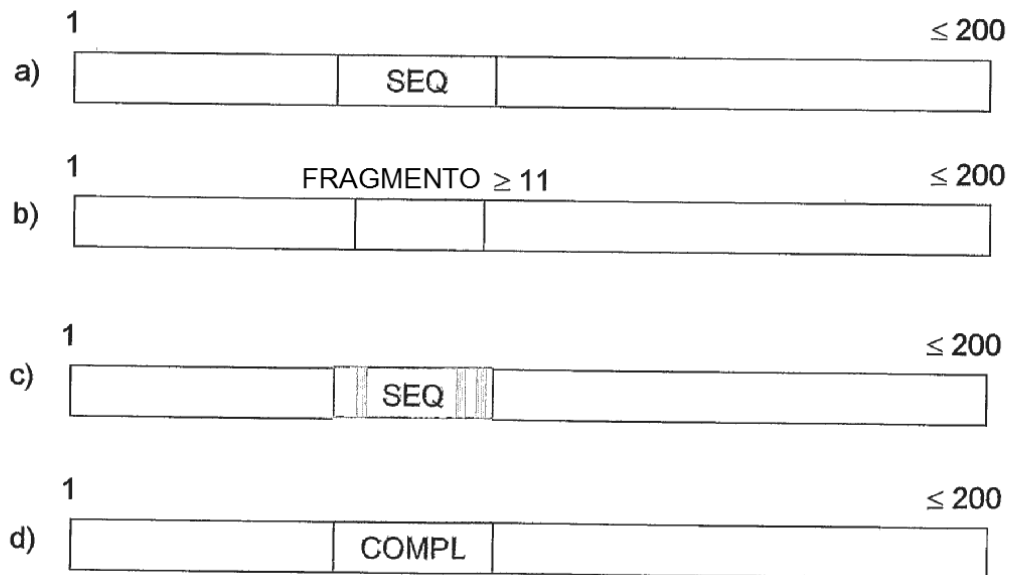


Figura 4

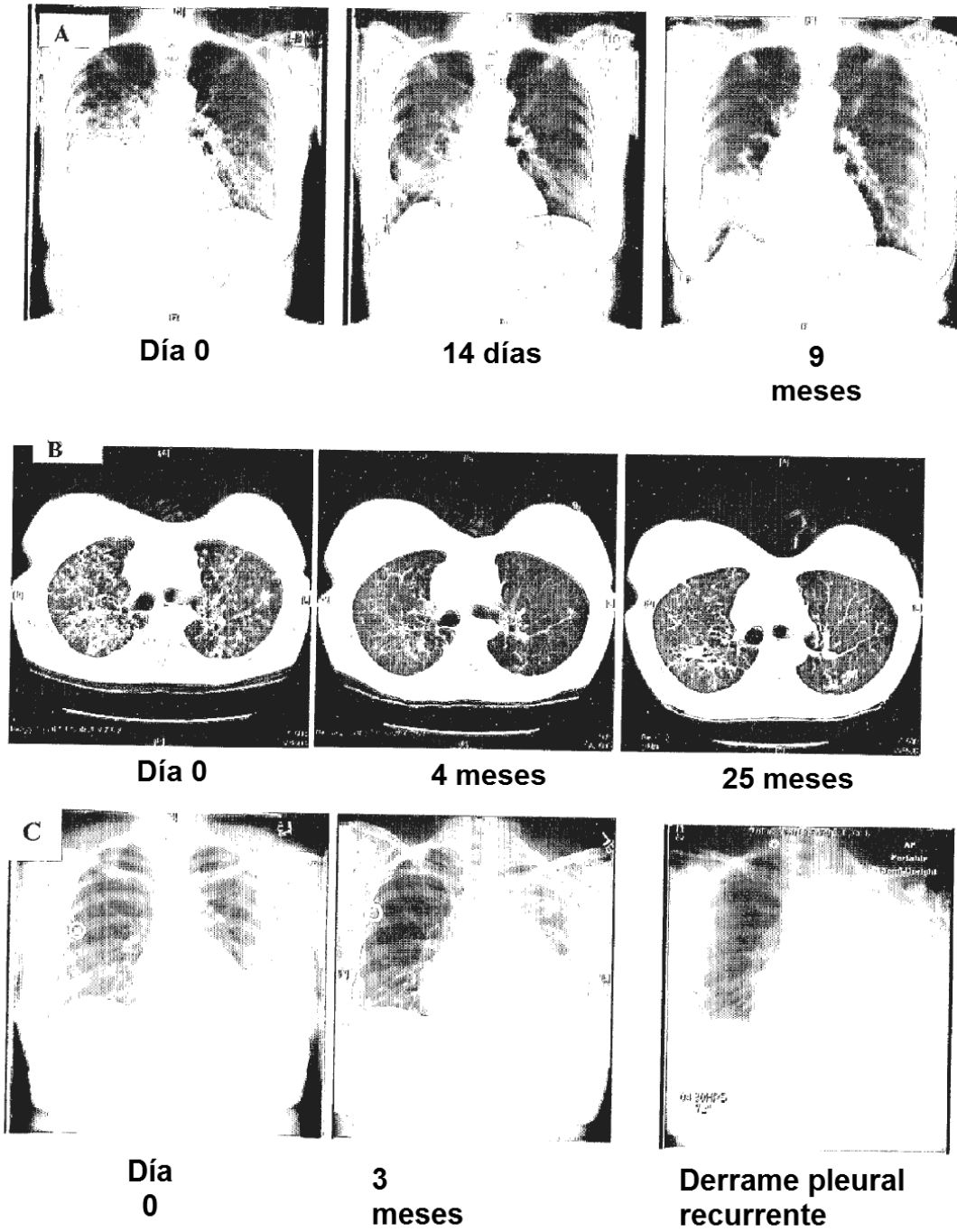
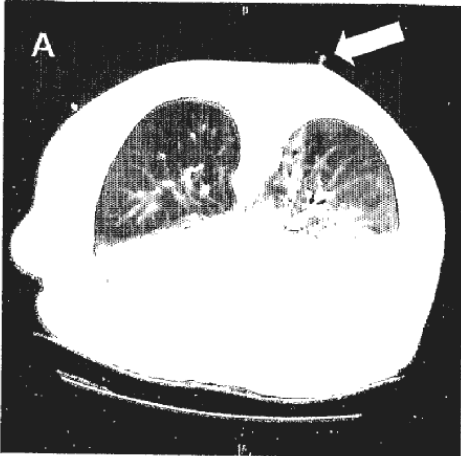


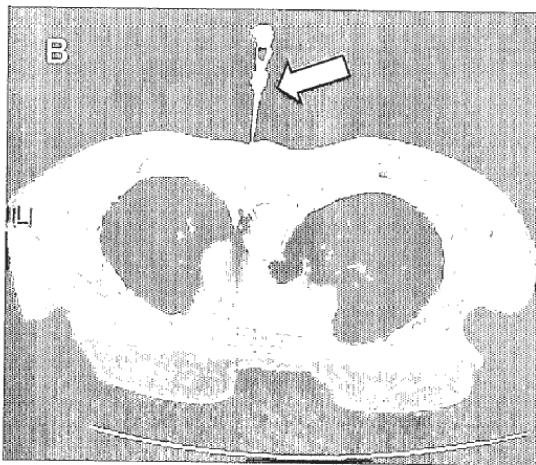
Figura 5



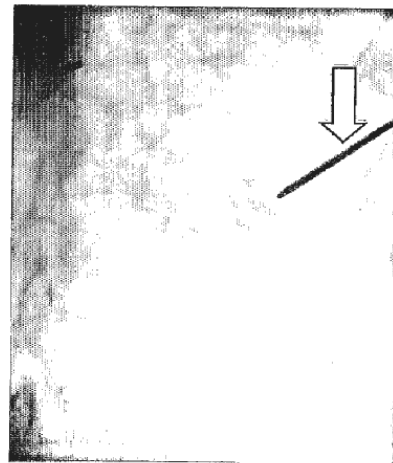
Biopsia guiada por TC - pulmón



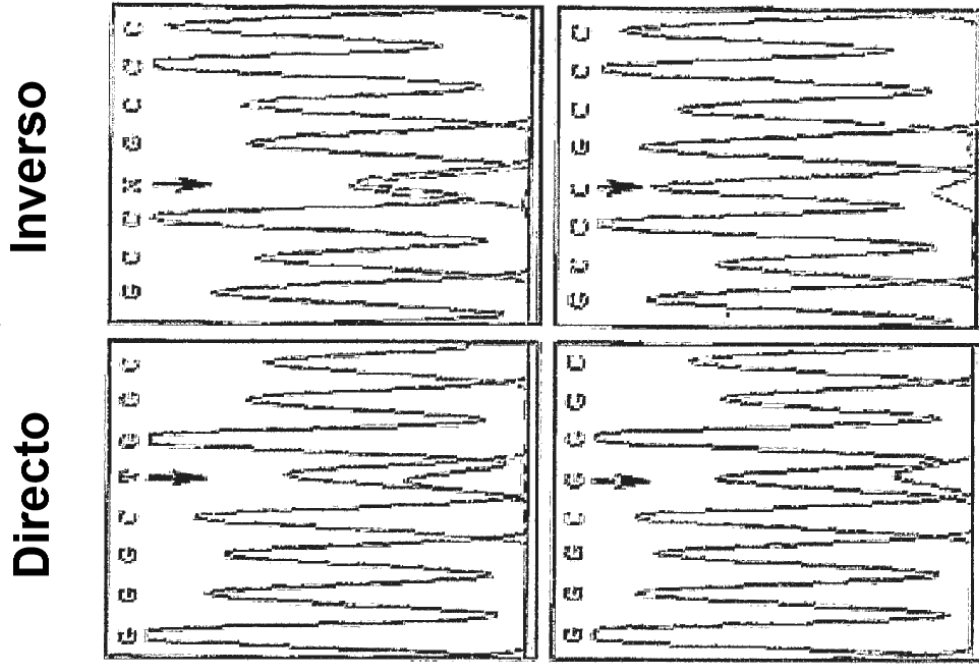
Derrame pleural



Biopsia guiada por TC - hueso



**Biopsia guiada
fluoroscópica - pulmón**



A.

**Lesión pulmonar
en aumento**

Derrame pleural

Caso 1 - exón 21

Figura 6

Figura 6B

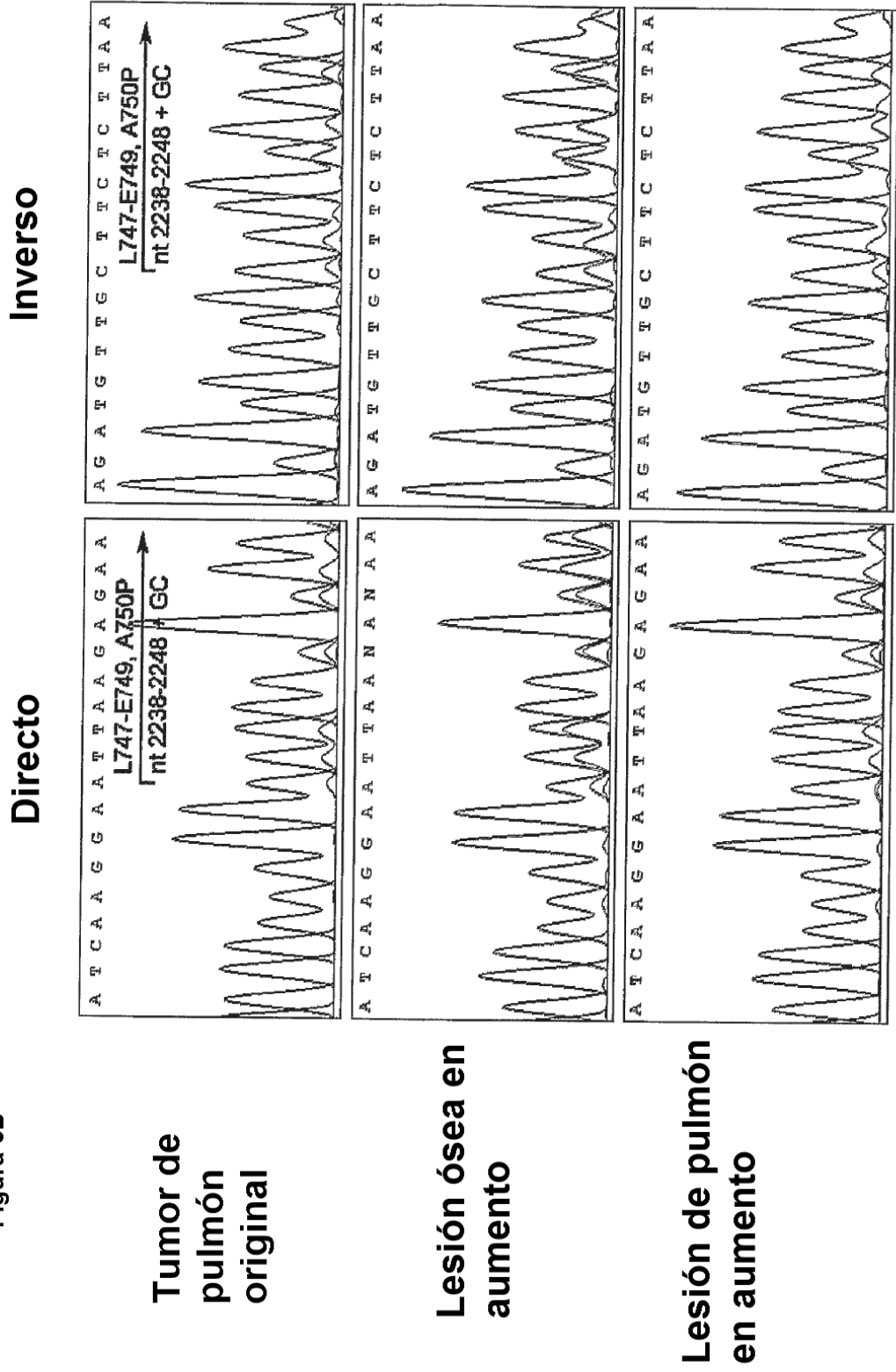
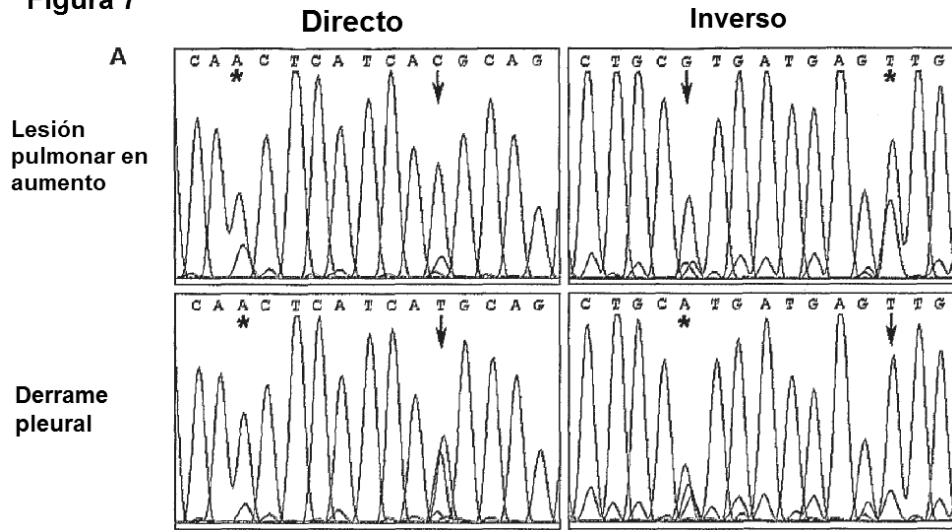
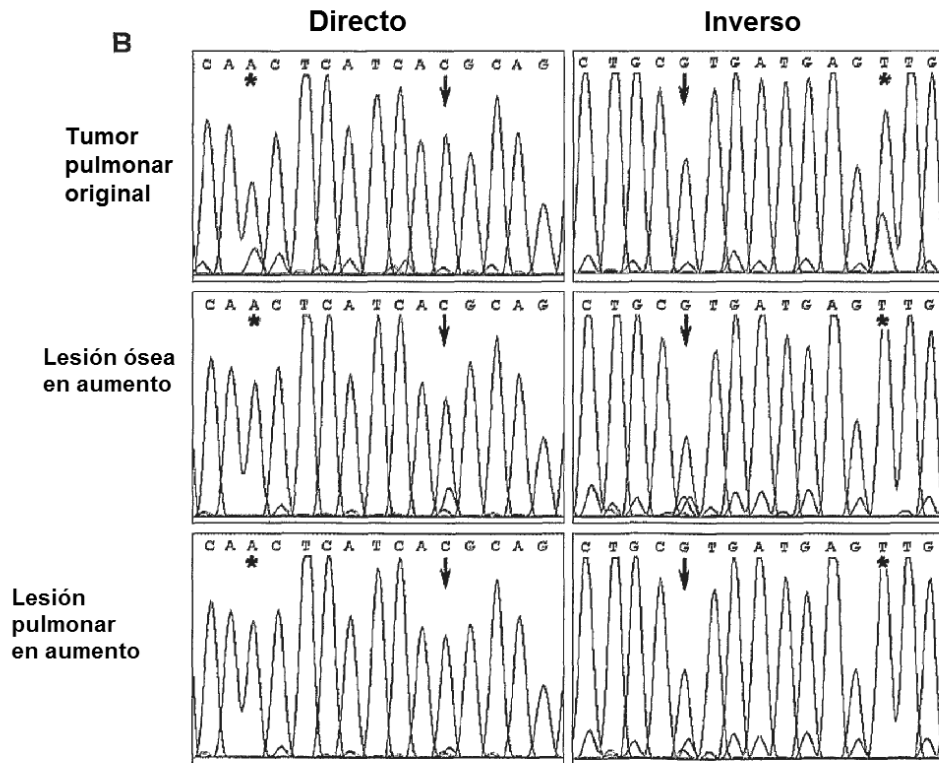


Figura 7



Caso 1 - exón 20



Caso 2 - exón 20

Figura 7
(cont.)

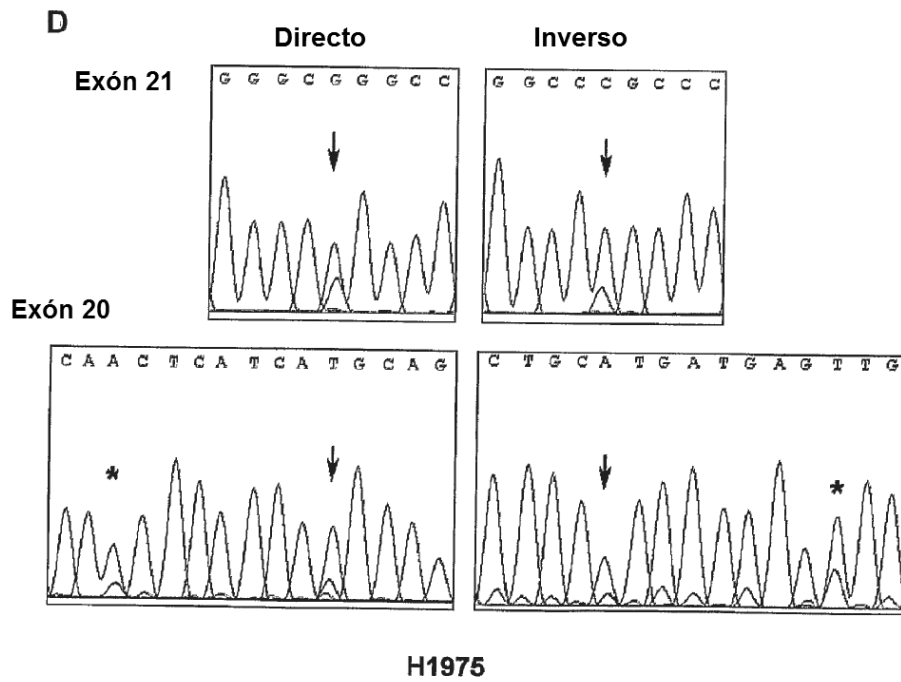
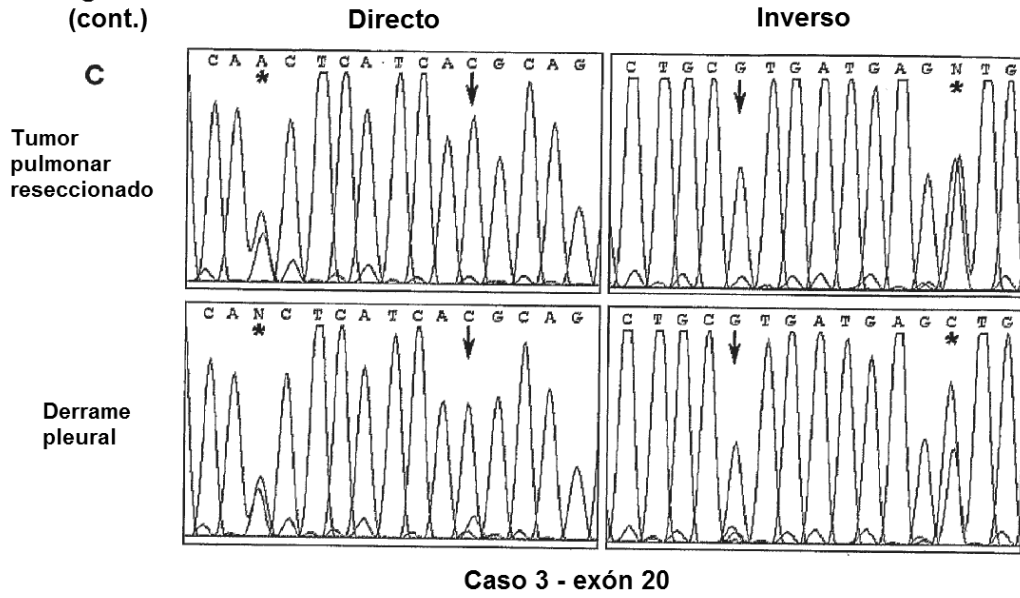


Figura 8

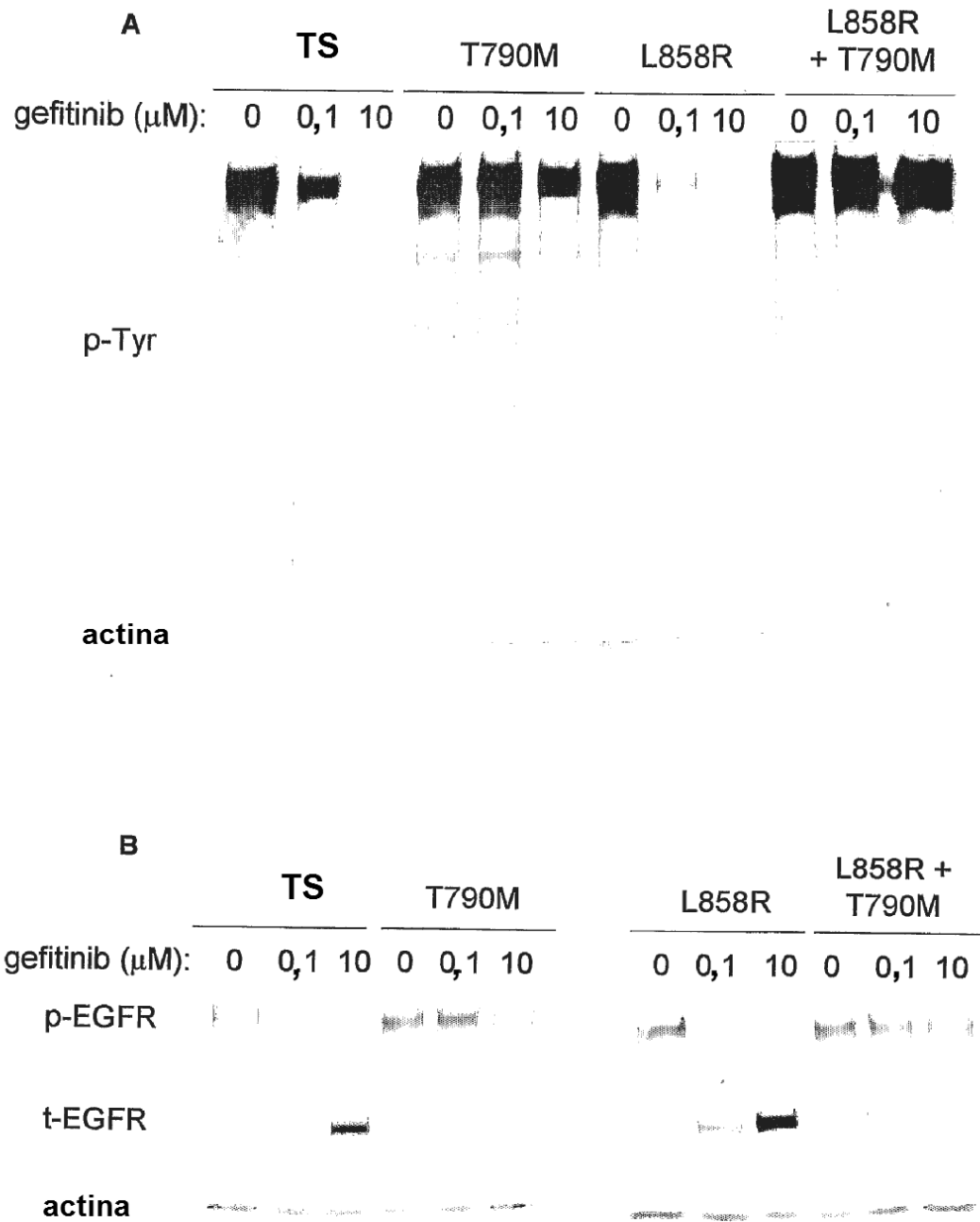


Figura 8 (cont.)

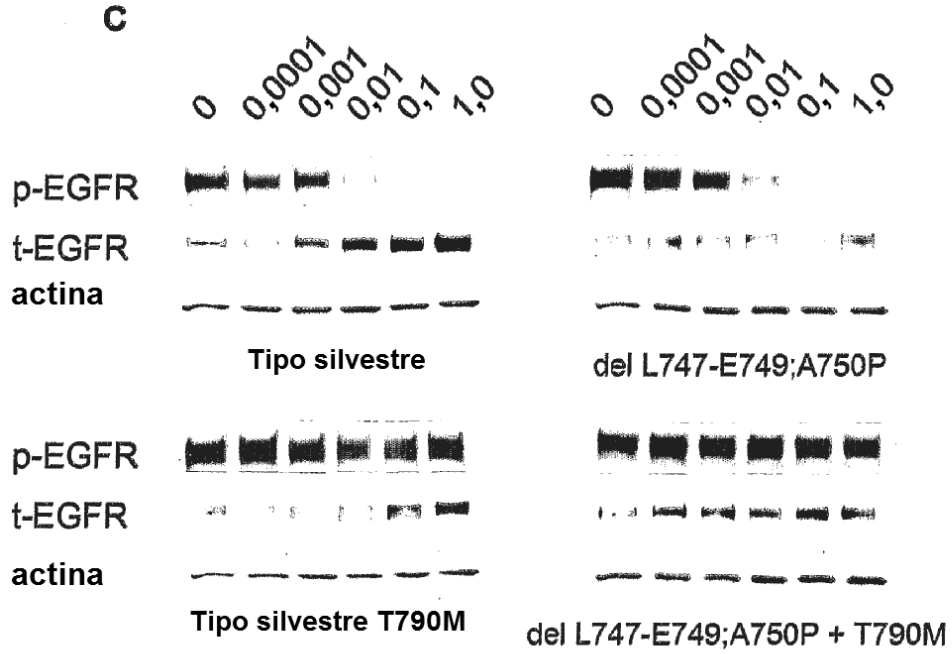


Figura 9

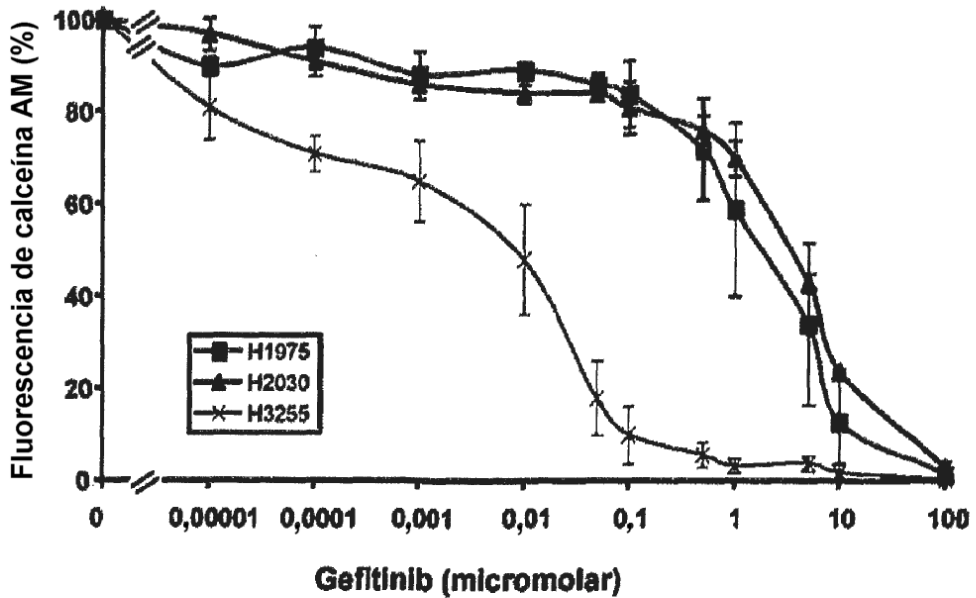


Figura 10

