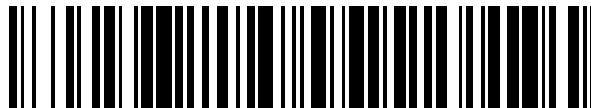


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 840**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2015 PCT/EP2015/072844**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055380**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2015 E 15775679 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3204510**

54 Título: **Mutaciones en el dominio cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico**

30 Prioridad:

09.10.2014 US 201462061965 P

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

07.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JIN, JANET;
HOGLUND, BRYAN;
LI, YAN y
LIU, WEI-MIN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 688 840 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutaciones en el dominio cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere al diagnóstico de cáncer y diagnóstico con fines terapéuticos para tratamientos contra el cáncer. En particular, la invención se refiere a la detección de mutaciones que son útiles para el diagnóstico y pronóstico así como para predecir la eficacia del tratamiento contra el cáncer.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), también conocido como HER1 o ErbB1, es un miembro de la familia de tirosina cinasas de tipo 1 de receptores del factor de crecimiento. Estas proteínas unidas a membrana poseen un dominio tirosina cinasa intracelular que interactúa con diversas vías de señalización. Tras la unión del ligando, los receptores en esta familia se someten a dimerización y posterior autofosforilación del dominio tirosina cinasa. La autofosforilación desencadena una cascada de eventos en las vías de señalización intracelular, incluyendo las vías Ras/MAPK, PI3K y AKT. A través de estas vías, las proteínas de la familia HER regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

20

Varias neoplasias malignas humanas se asocian con la expresión o función anómala de EGFR (Mendelsohn *et al.*, (2000), "The EGF receptor family as targets for cancer therapy", *Oncogene*, 19:6550-6565). En particular, se ha demostrado que algunos cánceres albergan mutaciones en el dominio cinasa del EGFR (exones 18-21). En el carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC), se demostró que estas mutaciones promueven las vías antiapoptóticas en células malignas (Pao *et al.*, (2004), "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib", *P.N.A.S.* 101 (36): 13306-13311; Sordella *et al.*, (2004), "Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways", *Science* 305 (5687): 1163-1167).

25

Se han desarrollado tratamientos dirigidos a EGFR. Por ejemplo, cetuximab (ERBITUX™) y panitumumab (VECTIBIX™) son anticuerpos anti-EGFR. Erlotinib (TARCEVA™) y gefitinib (IRESSA™) son quinazolinas útiles como inhibidores selectivos activos por vía oral de tirosina cinasa de EGFR. Estos fármacos son más eficaces en pacientes con cánceres que se impulsan por una actividad de EGFR anómala. Un estudio con enmascaramiento doble a gran escala aleatorizado de IRESSA™ (el estudio panasiático IRESSA (IPASS)) comparó gefitinib con la quimioterapia tradicional como tratamiento de primera línea en carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) (Mok *et al.* (2009), "Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma", *N Eng J Med* 361:947-957). El IPASS estudió 1.217 pacientes con histología de adenocarcinoma confirmada. El estudio reveló que la supervivencia sin progresión (SSP) fue significativamente más larga para IRESSA™ que la quimioterapia en pacientes con tumores con mutación de EGFR. Lo contrario fue cierto para tumores donde EGFR no se mutó: la SSP fue significativamente más larga para quimioterapia que IRESSA™. El estudio demostró que para mejorar las posibilidades de tratamiento exitoso de un paciente con cáncer de pulmón, se debe conocer el estado de mutación de EGFR.

35

40

El análisis de la evolución clínica reveló que los pacientes con tumores que albergan mutaciones en el dominio cinasa de EGFR (exones 18-21) tienen una respuesta mejor a erlotinib que los que tienen tumores que expresan EGFR natural (patente de EE. UU. n.º 7.294.468 y 7.960.118). Estas mutaciones predicen la respuesta a los inhibidores de las tirosina cinasas (TKI) tales como las quinazolinas erlotinib (TARCEVA™) y gefitinib (IRESSA™). Entre las mutaciones de EGFR, las deleciones y sustituciones sin cambio de pauta de lectura de nucleótidos en la región del exón 19 que incluye los nucleótidos 2235-2257 (correspondientes a los aminoácidos 746-753) son especialmente comunes en pacientes con cáncer de pulmón (véase la patente de EE. UU. n.º 7.294.468 y Lynch *et al.*, (2004) "Activating mutations in the epidermal growth factor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib", *NEJM* 350:2129). Se cree que estas mutaciones dan como resultado una cinasa activa con propiedades alteradas, incluyendo un incremento en la susceptibilidad a inhibición (Paez *et al.*, (2004) "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to Gefitinib therapy", *Science* 304:1497).

50

55

Algunas mutaciones en el dominio cinasa de EGFR son comunes, mientras que otras se producen con menos frecuencia. Sin embargo, es esencial que una prueba clínica para las mutaciones de EGFR se dirija a tantas mutaciones como sea posible. Esto garantizará que los pacientes con mutaciones infrecuentes no reciban un resultado de prueba "negativo falso". Si una mutación infrecuente queda sin detectar, el paciente con una mutación de este tipo no recibirá un tratamiento que potencialmente salva vidas. Por lo tanto, cuando se descubre una nueva mutación en el dominio cinasa de EGFR, la detección de esta mutación tiene el potencial de afectar a la evolución clínica de algunos pacientes.

60

65 **SUMARIO DE LA INVENCION**

En un modo de realización, la invención se refiere a una secuencia de ADN novedosa que comprende una mutación recientemente identificada en el exón 19 del gen EGFR humano que consiste en 2257-2277>GCC, o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del.

5 En un modo de realización, la invención es un procedimiento de identificación de un paciente que tiene un tumor que posiblemente alberga células con una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende someter a prueba la muestra del paciente para detectar la presencia del gen EGFR mutado caracterizado por la mutación 2257-2277>GCC, o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del en SEQ ID NO: 1; y, de este modo la presencia de la mutación en la muestra de dicho paciente indica la sensibilidad de dicho paciente a un compuesto inhibidor de EGFR. La invención se refiere además a un procedimiento de tratamiento de un paciente que tiene un tumor que posiblemente alberga células con una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende someter a prueba la muestra del paciente para detectar la presencia del gen EGFR mutado caracterizado por la mutación 2257-2277>GCC, o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del en SEQ ID NO: 1; y, si la mutación está presente, administrar al paciente un compuesto inhibidor de EGFR. El inhibidor puede ser, por ejemplo, cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib. El procedimiento puede comprender además detectar una o más de las mutaciones G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-I759 del T ins, S752-I759 del, P753-K757 del, M766-A767 del A1 ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y, 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC, 2264 C>A y E746-A750 del AP ins. En otras variaciones, las mutaciones se detectan por un procedimiento de detección específica de alelo o por secuenciación de ADN.

25 En otro modo de realización, la invención es un procedimiento de determinación de la probabilidad de respuesta de un paciente con cáncer a un tratamiento con inhibidor de EGFR (por ejemplo, tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa) que comprende: someter a prueba una muestra del paciente para detectar la mutación 2257-2277>GCC, o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del en el gen EGFR en la muestra del paciente y, si la mutación está presente, determinar que el paciente probablemente responderá al tratamiento con inhibidor de EGFR (por ejemplo, inhibidor de la tirosina cinasa). El tratamiento con inhibidor de EGFR puede ser, por ejemplo, tratamiento con cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib. El procedimiento puede comprender además someter a prueba la muestra del paciente para detectar una o más de las mutaciones G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-I759 del T ins, S752-I759 del, P753-K757 del, M766-A767 del A1 ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y, 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC, 2264 C>A y E746-A750 del AP ins en el gen EGFR y si se informa de cualquiera de las mutaciones como presente, determinar que el paciente probablemente responderá al tratamiento con inhibidor de EGFR o inhibidor de la tirosina cinasa. Las mutaciones se pueden detectar, por ejemplo, por un procedimiento de detección específica de alelo o por secuenciación de ADN.

45 En otro modo de realización, la invención se refiere a un compuesto para su uso en un procedimiento de tratamiento de un paciente que tiene un tumor que posiblemente alberga células con una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende: recomendar que la muestra del paciente se someta a prueba para detectar la presencia del gen EGFR mutado caracterizado por la mutación 2257-2277>GCC o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del en SEQ ID NO: 1; y si se detecta la mutación, administrar al paciente un compuesto inhibidor de EGFR. El compuesto inhibidor puede ser, por ejemplo, cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib. El procedimiento puede comprender además recomendar que la muestra del paciente se someta a prueba para detectar la presencia del gen EGFR mutado caracterizado por una o más de las mutaciones G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-I759 del T ins, S752-I759 del, P753-K757 del, M766-A767 del A1 ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y, 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC, 2264 C>A y E746-A750 del AP ins; y, si cualquiera de las mutaciones se detecta, administrar al paciente un compuesto inhibidor de la tirosina cinasa. Las mutaciones se pueden detectar, por ejemplo, por un procedimiento de detección específica de alelo o por secuenciación de ADN.

60 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es la secuencia de nucleótidos del gen EGFR humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes definiciones de los términos usados en el presente documento.

5 El término "n-m" o "n-m del" ("n-m del x") se refiere a una mutación que da como resultado un ácido nucleico que carece de los nucleótidos ("x" nucleótidos) entre las posiciones "n" y "m". El término "n-m>XYZ" se refiere a una mutación compleja donde el ácido nucleico carece de los nucleótidos originales entre las posiciones "n" y "m", pero se inserta la secuencia de nucleótidos XYZ en su lugar. Por ejemplo, el término "2257-2277>GCC" se refiere a una mutación que da como resultado un ácido nucleico que carece de los nucleótidos 2257-2277 de la secuencia natural y se inserta la secuencia de nucleótidos GCC en el lugar de los nucleótidos delecionados.

10 El término "cebador específico de alelo" o "cebador EA" se refiere a un cebador que se hibrida a más de una variante de la secuencia diana, pero que puede discriminar entre las variantes de la secuencia diana ya que solo con una de las variantes, el cebador se extiende eficazmente por la ácido nucleico polimerasa en condiciones adecuadas. Con otras variantes de la secuencia diana, la extensión es menos eficaz, ineficaz o indetectable.

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

20 Los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a hebras antiparalelas de polinucleótidos relacionados por las reglas de emparejamiento de bases de Watson y Crick. Los términos "perfectamente complementarias" o "complementarias al 100 %" se refieren a secuencias complementarias que tienen emparejamiento de Watson y Crick de todas las bases entre hebras antiparalelas, es decir, no existen emparejamientos erróneos entre cualquiera de dos bases en la doble hélice polinucleotídica. Sin embargo, se forman dobles hélices entre hebras antiparalelas incluso en ausencia de una perfecta complementariedad. Los términos "parcialmente complementaria" o "incompletamente complementaria" se refieren a cualquier alineación de bases entre hebras polinucleotídicas antiparalelas que sea perfecta en menos de un 100 % (por ejemplo, que exista al menos una base con emparejamiento erróneo o no emparejada en la doble hélice polinucleotídica). Las dobles hélices entre hebras parcialmente complementarias son en general menos estables que las dobles hélices entre hebras perfectamente complementarias.

25 El término "muestra" se refiere a cualquier composición que contiene o que se supone que contiene ácido nucleico. Esto incluye una muestra de tejido o líquido aislado de un individuo, por ejemplo, piel, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, líquido sinovial, orina, lágrimas, glóbulos sanguíneos, órganos y tumores, y también para muestras en cultivos *in vitro* establecidos a partir de células extraídas de un individuo, incluyendo los tejidos incluidos en parafina fijados con formol (FFPET) y ácidos nucleicos aislados de los mismos.

30 Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de manera intercambiable. "Oligonucleótido" es un término usado a veces para describir un polinucleótido más corto. Un oligonucleótido puede estar compuesto de al menos 6 nucleótidos, por ejemplo, al menos aproximadamente 10-12 nucleótidos, o al menos aproximadamente 15-30 nucleótidos correspondientes a una región de la secuencia de nucleótidos designada.

35 El término "secuencia principal" se refiere a la secuencia de nucleótidos en un polinucleótido u oligonucleótido. Las modificaciones de nucleótidos, tales como modificaciones de bases nitrogenadas, modificaciones de azúcares u otras modificaciones de la cadena principal no son parte de la secuencia principal. Los marcadores, tales como cromóforos conjugados con los oligonucleótidos, tampoco son parte de la secuencia principal. Por tanto, dos oligonucleótidos pueden compartir la misma secuencia principal pero diferir con respecto a las modificaciones y los marcadores.

40 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y puede actuar como punto de iniciación de síntesis a lo largo de una hebra complementaria de ácido nucleico en condiciones adecuadas para dicha síntesis. Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y normalmente se marca de manera detectable. La sonda puede tener modificaciones, tales como una modificación en el extremo 3' que hace que la sonda sea no extensible por las ácido nucleico polimerasas y uno o más cromóforos. Un oligonucleótido con la misma secuencia puede servir como cebador en un ensayo y una sonda en un ensayo diferente.

45 Como se usa en el presente documento, el término "secuencia diana", "ácido nucleico diana" o "diana" se refiere a una porción de la secuencia de ácido nucleico que se va a amplificar, detectar o bien ambas.

50 Los términos "hibridado" e "hibridación" se refieren a la interacción con emparejamiento de bases entre dos ácidos nucleicos, lo que da como resultado la formación de una doble hélice. No es un requisito que dos ácidos nucleicos tengan una complementariedad de un 100 % en toda su longitud completa para lograr la hibridación.

Los términos "hibridación selectiva" e "hibridación específica" se refieren a la hibridación de un ácido nucleico predominantemente (un 50 % o más de la molécula de hibridación) o casi exclusivamente (un 90 % o más de la molécula de hibridación) a un ácido nucleico particular presente en una mezcla de complejo donde también están presentes otros ácidos nucleicos. Por ejemplo, en condiciones de PCR típicas, los cebadores se hibridan específicamente a los ácidos nucleicos diana para la exclusión de los ácidos nucleicos no diana también presentes en la solución. Los cebadores hibridados específicamente impulsan la amplificación del ácido nucleico diana para producir un producto de amplificación del ácido nucleico diana que es al menos el producto de amplificación más predominante y es preferentemente el producto de amplificación casi exclusivo (por ejemplo, que representa un 90 % o más de todos los productos de amplificación en la muestra). Preferentemente, el producto de amplificación no específico está presente en cantidades tan pequeñas que es no detectable o bien se detecta en cantidades tan pequeñas como para que sea fácilmente distinguible del producto de amplificación específico. De forma similar, las sondas se hibridan específicamente a los ácidos nucleicos diana para la exclusión de los ácidos nucleicos no diana también presentes en la mezcla de reacción. Las sondas hibridadas específicamente permiten la detección específica del ácido nucleico diana para generar una señal detectable que sea al menos la señal más predominante y sea preferentemente la señal casi exclusiva (por ejemplo, que representa un 90 % o más de todos los productos de amplificación en la muestra).

La presente invención describe una mutación novedosa en el dominio cinasa de EGFR que es útil para el diagnóstico y pronóstico de cáncer, para diseñar un régimen de tratamiento y predecir el éxito del tratamiento.

La presente invención comprende una mutación novedosa 2257-2277>GCC en el exón 19 (porción del dominio cinasa) del gen EGFR humano. La mutación 2257-2277>GCC y la correspondiente secuencia natural se muestran en la tabla 1. La mutación comprende dos deleciones sin cambio de pauta de lectura separadas: 2257-2262 del 6 y 2266-2277 del 12 como se ilustra en la tabla 1.

Tabla 1: Nueva mutación y secuencia natural en el exón 19 del gen EGFR humano

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS
2	WT 2250-2280	AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTC
3	2257-2277>GCC	AACATCT-----GCC

En un modo de realización, la presente invención comprende oligonucleótidos para detectar la mutación 2257-2277>GCC (o cualquiera de las mutaciones 2257-2262 del y 2266-2277 del) en el exón 19 del gen EGFR humano. Usando la divulgación de las nuevas mutaciones proporcionadas en el presente documento, un experto en la técnica es capaz de diseñar un oligonucleótido adecuado que puede detectar específicamente las mutaciones novedosas. En variaciones de este modo de realización, algunos de los oligonucleótidos son cebadores específicos de alelo para su uso en PCR específica de alelo (véase la patente de EE. UU. n.º 6.627.402). Un cebador específico de alelo posee típicamente un extremo 3' emparejado con la secuencia diana (la secuencia mutante) y emparejado erróneamente a la secuencia alternativa (por ejemplo, la secuencia natural). Opcionalmente, los cebadores específicos de alelo pueden contener emparejamientos erróneos internos tanto con la secuencia diana natural como la mutante. Se ha demostrado que los emparejamientos erróneos adicionales en cebadores de PCR específicos de alelo incrementan la selectividad de los cebadores (véase la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2010/0099110). Para una extensión exitosa de un cebador, el cebador necesita tener al menos complementariedad parcial con la secuencia diana. En general, la complementariedad en el extremo 3' del cebador es más crítica que la complementariedad en el extremo 5' del cebador (Innis *et al.* Eds., PCR Protocols, (1990) Academic Press, capítulo 1, pp. 9-11). Esto quiere decir que las variaciones del extremo 5', es decir, adiciones, sustituciones o retirada de nucleótidos en el extremo 5', no afectan al rendimiento de un cebador en un ensayo PCR. La presente invención engloba cebadores específicos de alelo que pueden impulsar selectivamente la amplificación de una porción del exón 19 del gen EGFR humano que contiene la mutación 2257-2277>GCC (o cualquiera de las mutaciones 2257-2262 del y 2266-2277 del) pero que no impulsarían la amplificación de las mismas dianas que tienen una secuencia natural en las posiciones 2257-2277 (o posiciones 2257-2262, o posiciones 2266-2277).

En otras variaciones de este modo de realización, algunos de los oligonucleótidos son sondas de detección específicas para la mutación 2257-2277>GCC (o cualquiera de las mutaciones 2257-2262 del y 2266-2277 del) en el exón 19 del gen EGFR humano. Una sonda de detección típica forma un híbrido estable con la secuencia diana (por ejemplo, la secuencia con la mutación 2257-2277>GCC) y no forma un híbrido estable con la secuencia alternativa (por ejemplo, la secuencia natural) en las condiciones de reacción en las que se lleva a cabo la detección. Para una hibridación de sonda exitosa, la sonda necesita tener al menos complementariedad parcial con la secuencia diana. En general, la complementariedad próxima a la porción central de la sonda es más crítica que la complementariedad en los extremos de la sonda (Innis *et al.*, PCR Protocols, (1990), Academic Press, capítulo 32, pp. 262-267). Esto quiere decir que las variaciones de los extremos de la sonda, es decir, adiciones, sustituciones o retirada de unos pocos nucleótidos, no afectan al rendimiento de la sonda en la

hibridación. La presente invención engloba sondas de detección que se pueden hibridar selectivamente a una porción del exón 19 del gen EGFR humano que contiene la mutación 2257-2277>GCC (o cualquiera de las mutaciones 2257-2262 del y 2266-2277 del) pero no se hibridaría a las mismas dianas que tienen una secuencia natural en las posiciones 2257-2277 (o posiciones 2257-2262, o posiciones 2266-2277). En otras variaciones de este modo de realización, la sonda tiene una estructura particular, que incluye una nucleoproteína (NP), un ácido nucleico bloqueado (ANB), una sonda baliza molecular (Tyagi *et al.*, (1996) Nat. Biotechnol. 3:303-308) o cebadores para autosondas SCORPIONS® (Whitcombe *et al.*, (1999) Nat. Biotechnol. 8:804-807). Una sonda se puede marcar con un marcador radioactivo, fluorescente o cromóforo. Por ejemplo, las mutaciones se pueden detectar por la reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo ultrarrápida, donde la hibridación de una sonda al producto de amplificación da como resultado la digestión enzimática de la sonda y la detección de los productos de digestión (sonda TaqMan®, Holland *et al.*, (1991) P.N.A.S. USA 88:7276-7280). La hibridación entre la sonda y la diana también se puede detectar detectando el cambio de fluorescencia debido a la formación de una doble hélice de ácido nucleico (publicación de solicitud de EE. UU. n.º 2010/0143901) o detectando la temperatura de fusión característica del híbrido entre la sonda y la diana (patente de EE. UU. n.º 5.871.908).

El gen EGFR mutante o el producto génico se puede detectar en tumores u otras muestras corporales tales como orina, esputo o plasma sanguíneo donde se sabe que están presentes células derivadas del tumor o ácidos nucleicos extracelulares circulantes.

Se ha informado de mutaciones activadoras de EGFR en un 10-15 % de pacientes occidentales no seleccionados y en un 30-40 % de pacientes asiáticos con carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC). Entre las mutaciones de EGFR halladas en NSCLC, la mayoría se producen en los primeros cuatro exones del dominio tirosina cinasa intracelular. Específicamente, diversas delecciones sin cambio de pauta de lectura en el exón 19 representan un ~45 % de todas las mutaciones activadoras (Cooper *et al.*, (2014) Molecular biology of lung cancer, J Thorac Dis 2013;5(S5):S479-S490). El cáncer de pulmón y el adenocarcinoma de pulmón con mutación de EGFR en no fumadores como tales se consideran en la actualidad como subconjuntos tumorales biológicos distintos en vista de la patogenia molecular, véase Thu *et al.*, (2012) "Lung adenocarcinoma of never smokers and smokers harbor differential regions of genetic alteration and exhibit different levels of genomic instability", PLoS One 7(3):e33003. Este subconjunto tumoral se caracteriza por su reactividad única a los inhibidores de las tirosina cinasas (TKI), véase Koehler *et al.*, (2013) "Afatinib, erlotinib and gefitinib in the first-line therapy of EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma: a review", Onkologie 2013;36(9):510-8.

En un modo de realización, la invención es un procedimiento de determinación de la probabilidad de respuesta de un tumor maligno en un paciente a inhibidores de las tirosina cinasas (TKI) o inhibidores de EGFR. El procedimiento comprende someter a prueba la muestra del paciente para detectar la presencia de la mutación 2257-2277>GCC (o cualquiera de las mutaciones 2257-2262 del y 2266-2277 del) en el exón 19 de EGFR, y si se halla la mutación, determinar que el tratamiento es probable que sea exitoso. En variaciones de este modo de realización, los inhibidores de las tirosina cinasas son inhibidores de la cinasa de EGFR o los inhibidores de EGFR son, por ejemplo, cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.

En un modo de realización, la invención es un procedimiento de identificación de un paciente que tiene un tumor que posiblemente alberga células con una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende someter a prueba la muestra del paciente o recomendar que la muestra del paciente se someta a prueba para detectar la presencia del gen EGFR mutado caracterizado por la mutación 2257-2277>GCC, o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del en SEQ ID NO: 1; de este modo la presencia de la mutación en la muestra de dicho paciente indica o se espera que indique la sensibilidad de dicho paciente a un compuesto inhibidor de EGFR. En variaciones de este modo de realización, el inhibidor de EGFR es, por ejemplo, cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.

En variaciones de estos modos de realización, cada procedimiento comprende además someter a prueba la muestra del paciente para detectar una más de las siguientes mutaciones: G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-1759 del T ins, S752-1759 del, P753-K757 del, M766-A767 del AI ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y, 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC, 2264 C>A y E746-A750 del AP ins; y si están presentes una o más de las mutaciones, determinar que el tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas es probable que sea exitoso.

La invención se refiere además a un compuesto inhibidor de EGFR para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene un tumor que posiblemente alberga células con un gen EGFR administrando una cantidad eficaz del compuesto inhibidor de EGFR a dicho paciente, en el que se ha determinado que el gen EGFR del paciente contiene una forma del gen EGFR que comprende al menos una variación del ácido nucleico que indica que el tratamiento dirigido a EGFR será eficaz en el paciente, en el que la variación del ácido nucleico es la mutación 2257-2277>GCC (o cualquiera de las mutaciones 2257-2262 del y 2266-2277 del) en el exón 19, comprendiendo el uso someter a prueba la muestra del paciente para detectar la mutación mencionada anteriormente, y si se

detecta la mutación, administrar al paciente un inhibidor de la tirosina cinasa (TKI) o un inhibidor de EGFR o un inhibidor de TKI de EGFR. En variaciones de este modo de realización, los inhibidores de las tirosina cinasas son inhibidores de la cinasa de EGFR tales como, por ejemplo, erlotinib o gefitinib o inhibidores de EGFR tales como, por ejemplo, cetuximab o panitumumab.

5 En otra variación, el uso o procedimiento comprende además someter a prueba la muestra del paciente para detectar una más de las siguientes mutaciones: G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-1759 del T ins, S752-1759 del, P753-K757 del, M766-A767 del AI ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y, 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC, 2264 C>A y E746-A750 del AP ins; y si están presentes una o más de las mutaciones, administrar al paciente un compuesto que inhibe la señalización de la proteína EGFR mutante codificada por el gen mutado. Los cambios de nucleótidos que provocan las mutaciones enumeradas anteriormente y los procedimientos de detección de los mismos se divulgan en las patentes de EE. UU. n.º 7.294.468 y 7.960.118 (mutación E746-A750 del AP ins) y la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º US2013/0121996 (mutaciones 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC y 2264 C>A). Se pueden detectar múltiples mutaciones simultáneamente o por separado usando hibridación a múltiples sondas, por ejemplo en un formato de inmunotransferencia por puntos o micromatriz de ácido nucleico, PCR múltiple, por ejemplo PCR específica de alelo múltiple y PCR múltiple seguido de un ensayo de fusión de sonda con cada sonda caracterizada por una temperatura de fusión específica para mutación.

25 También se pueden detectar una mutación individual o múltiples mutaciones por secuenciación de ácido nucleico. Se puede utilizar cualquiera de varias tecnologías de secuenciación. Se puede realizar la secuenciación, por ejemplo, por el procedimiento de Sanger o el procedimiento de Sanger automatizado. Otras tecnologías incluyen la tecnología de secuenciación de moléculas individuales tal como la tecnología True Single Molecule Sequencing (tSMS) de Helicos Biosciences, Cambridge, Mass., (véase Harris *et al.*, Science 320:106-109 (2008)). Otro ejemplo es la secuenciación 454 de 454 Life Sciences, Bradford, Conn., (véase Margulies *et al.* Nature 437:376-380 (2005)). Aún otro ejemplo es la tecnología SOLiD™ (Applied Biosystems, Foster City, Cal.). Aún otro ejemplo es la tecnología de secuenciación Single Molecule, Real-Time (SMRT™) de Pacific Biosciences, Novato, Cal. Aún otro ejemplo es la secuenciación por nanoporos (véase Soni *et al.*, Clin Chem 53: 1996-2001 (2007)).

35 Otros ejemplos de tecnología de secuenciación adecuada incluyen la micromatriz de transistor de efecto de campo sensible a especies químicas (chemFET) (véase la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0026082). Aún otro ejemplo es el procedimiento de microscopía electrónica de transmisión (TEM), denominado Individual Molecule Placement Rapid Nano Transfer (IMPRNT) (véase la publicación de patente PCT WO 2009/046445). Aún otro ejemplo es la secuenciación de molécula individual Ion Torrent™ de Life technologies (Foster City, Cal.). Aún otro ejemplo es la secuenciación masiva en paralelo de millones de fragmentos de ADN por medio de secuenciación por síntesis y química de secuenciación a base de finalizadores reversibles (véase Bentley *et al.*, Nature 6:53-59 (2009)).

45 Algunas plataformas y tecnologías de secuenciación están comercialmente disponibles, tales como la plataforma de secuenciación por hibridación de Affymetrix Inc. (Sunnyvale, Cal.) y las plataformas de secuenciación por síntesis de 454 Life Sciences (Bradford, Conn.), Illumina (San Diego, Cal.) y Helicos Biosciences (Cambridge, Mass.). Otros procedimientos aplicables incluyen la secuenciación por fijación en la plataforma de Applied Biosystems (Foster City, Cal.). Otras tecnologías de secuenciación adecuadas incluyen, pero no se limitan a, la tecnología SMRT™ de Pacific Biosciences (Novato, Cal.), y la tecnología de secuenciación por nanoporos desarrollada, por ejemplo, por Oxford Nanopore Technologies (Oxford, Reino Unido).

55 Aún en otro modo de realización, la invención se refiere a un compuesto para su uso en un procedimiento de tratamiento de un paciente que tiene un tumor que comprende someter a prueba la muestra del paciente (o recomendar que la muestra del paciente se someta a prueba) para detectar la mutación 2257-2277>GCC (o cualquiera de las mutaciones 2257-2262 del y 2266-2277 del) en el exón 19 del gen EGFR y si se detecta la mutación, administrar al paciente un inhibidor de EGFR, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo o un inhibidor de la tirosina cinasa (TKI). En variaciones de este modo de realización, el inhibidor de EGFR es, por ejemplo, cetuximab o panitumumab; y el inhibidor de la tirosina cinasa es un erlotinib o gefitinib.

60 En otras variaciones de este modo de realización, el procedimiento comprende además someter a prueba la muestra del paciente (o recomendar que la muestra del paciente se someta a prueba) para detectar una más de las siguientes mutaciones: G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-1759 del T ins, S752-1759 del, P753-K757 del, M766-A767 del AI ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y, 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC,

2264 C>A y E746-A750 del AP ins; y si están presentes una o más de las mutaciones, administrar al paciente un inhibidor de EGFR, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo o un inhibidor de la tirosina cinasa (TKI).

Ejemplo 1

5

Identificación de la mutación en muestras de pacientes con cáncer de pulmón

10

Se obtuvieron muestras de tejido de pacientes con cáncer de pulmón (NSCLC). Se preservaron las muestras de biopsia como tejido incluido en parafina fijado con formol (FFPET). Se aislaron ácidos nucleicos de las muestras y se sometieron a secuenciación directa en el secuenciador de genoma Illumina MISEQ™ (Illumina, Inc., San Diego, Cal.).

15

Se detectó la mutación 2257-2277>GCC (como una combinación de 2257-2262 del y 2266-2277 del) en la muestra E10. Se detectó la mutación en 9234 de 17570 lecturas de secuencias (52,56 %). Se cree que la heterogeneidad de las lecturas de secuencias proviene de la heterogeneidad genética del tumor así como de la presencia de células no tumorales en la muestra de biopsia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de identificación de un paciente que tiene un tumor que posiblemente alberga células con una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende someter a prueba la muestra del paciente para detectar la presencia del gen EGFR mutado **caracterizado por** la mutación 2257-2277>GCC, o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del en SEQ ID NO: 1; de este modo la presencia de la mutación en la muestra de dicho paciente indica la sensibilidad de dicho paciente a un compuesto inhibidor de EGFR.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto inhibidor de EGFR es cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además someter a prueba la muestra del paciente para detectar la presencia del gen EGFR mutado **caracterizado por** una o más de las mutaciones G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-1759 del T ins, S752-I759 del, P753-K757 del, M766-A767 del AI ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y, 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC, 2264 C>A y E746-A750 del AP ins; y si están presentes una o más de las mutaciones, determinar que el tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa es probable que sea exitoso.
- 20 4. Un procedimiento de determinación de la probabilidad de respuesta de un paciente con cáncer al tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa que comprende:
 - 25 (a) someter a prueba la muestra del paciente para detectar la mutación 2257-2277>GCC, o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del en el gen EGFR, en la muestra del paciente y, si la mutación está presente,
 - 30 (b) determinar que el paciente probablemente responderá al tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa comprende cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 4 o 5, que comprende además en la etapa (a), someter a prueba además la muestra del paciente para detectar una o más de las mutaciones G719A, G719C, K745-A750 del K ins, E746V, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858P, L858R, E746-R748 del, E746-S752 del V ins, L747-E749 del, L747-A750 del P ins, L747-T751 del, L747-T751 del P ins, L747-P753 del S ins, L747-S752 del, R748-P753 del, T751-1759 del T ins, S752-I759 del, P753-K757 del, M766-A767 del AI ins, S768-V769 del SVA ins, G779S, P848L, G857V, L858R, L861Q, L883S, D896Y, 2236_2248>ACCC, 2237_2244>CGCCC, 2252_2277>AC, 2240-2264>CGAAAGA, 2239_2240 TT>CC, 2264 C>A y E746-A750 del AP ins en el gen EGFR; y en la etapa (b), si se informa de que cualquiera de las mutaciones está presente, determinar que el paciente probablemente responderá al tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa.
- 45 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se detectan una o más mutaciones por un procedimiento de detección específica de alelo o por secuenciación de ADN.
- 50 8. Un procedimiento de detección de la mutación 2257-2277>GCC, o mutación 2257-2262 del, o mutación 2266-2277 del en el gen EGFR humano con un oligonucleótido específico de mutación.
- 55 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el oligonucleótido es un cebador de amplificación o una sonda de detección.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que se detectan una o más mutaciones por un procedimiento de detección específica de alelo o por secuenciación de ADN.

FIGURA 1: SEQ ID NO: 1

1 ATGCGACCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCTGCCCC
 61 GCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCACGCAG
 121 TTGGGCACTTTTGAAGATCATTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTGAGGTG
 181 GTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCTTAAAG
 241 ACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAATTCCT
 301 TTGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCTATGCCTTAGCA
 361 GTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAAACCGGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAAATTTA
 421 CAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTTCAGCAACAACCCTGCCCTGTGCAACGTGGAG
 481 AGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTCGATGGACTTC
 541 CAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGCTGCTGG
 601 GGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAAATCATCTGTGCCCAGCAGTGCTCC
 661 GGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCAGGCTGC
 721 ACAGGCCCCCGGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCGAGACGAAGCCACGTGC
 781 AAGGACACCTGCCCCCACTCATGCTCTACAACCCACCACGTACCAGATGGATGTGAAC
 841 CCCGAGGGCAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCCGTAATTATGTG
 901 GTGACAGATCACGGCTCGTGCCTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGGAGGAA
 961 GACGGCGTCCGCAAGTGTAAAGAAGTGCGAAGGGCCTTGCCGCAAAGTGTGTAACGGAATA
 1021 GGTATTTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTTAAACACTTCAA
 1081 AACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCC
 1141 TTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAA
 1201 ATCACAGGGTTTTTGTGATTTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTT
 1261 GAGAACCTAGAAATCATAACGCGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTC
 1321 GTCAGCCTGAAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGAT
 1381 GTGATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTG
 1441 TTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAG
 1501 GCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCC
 1561 AGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGAAC

FIGURA 1 (CONT.)

1621 CTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCA
 1681 GAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACCTGTATC
 1741 CAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATG
 1801 GGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGC
 1861 CATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGG
 1921 CCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTG
 1981 GCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTTCGGAAGCGCACGCTGCGG
 2041 AGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAAC
 2101 CAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTGCTGGGCTCC
 2161 GGTGCGTTCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATT
 2221 **CCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTC**
 2281 GATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCTGGGCATC
 2341 TGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGAC
 2401 TATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAG
 2461 ATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTGGCAGCC
 2521 AGGAACGTACTGGTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAA
 2581 CTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATCAAGTGG
 2641 ATGGCATTGGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGATGTCTGGAGCTAC
 2701 GGGGTGACTGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACCGGAATCCCTGCC
 2761 AGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAACGCCTCCCTCAGCCACCCATATGTACC
 2821 ATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGCTGGATGATAGACGCAGATAGTCGCCCAAAG
 2881 TTCCGTGAGTTGATCATCGAATTCTCCAAAATGGCCCCGAGACCCCAGCGCTACCTTGTC
 2941 ATTCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCTACAGACTCCAACCTTCTACCGTGCC
 3001 CTGATGGATGAAGAAGACATGGACGACGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATCCCACAG
 3061 CAGGGCTTCTTCAGCAGCCCCTCCACGTCACGGACTCCCCTCCTGAGCTCTCTGAGTGCA
 3121 ACCAGCAACAATTCCACCGTGGCTTGCATTGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGTCCCATC
 3181 AAGGAAGACAGCTTCTTGCAGCGATACAGCTCAGACCCCCACAGGCGCCTTGACTGAGGAC

FIGURA 1 (CONT.)

3241 AGCATAGACGACACCTTCCTCCCAGTGCCTGAATACATAAAACCAGTCCGTTCCCAAAGG
3301 CCCGCTGGCTCTGTGCAGAATCCTGTCTATCACAATCAGCCTCTGAACCCGCGCCCAGC
3361 AGAGACCCACACTACCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTATCTCAAC
3421 ACTGTCCAGCCCACCTGTGTCAACAGCACATTCGACAGCCCTGCCCACTGGGCCAGAAA
3481 GGCAGCCACCAAATTAGCCTGGACAACCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCCAAGGAA
3541 GCCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTAAGGGTC
3601 GCGCCACAAAGCAGTGAATTTATTGGAGCATGA