

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 080**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

G01N 33/74 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2014 PCT/EP2014/079477**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16015788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2014 E 14821676 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3174896**

54 Título: **Mutaciones en el dominio extracelular III del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico**

30 Prioridad:

28.07.2014 EP 14382288

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

07.12.2018

73 Titular/es:

FUNDACIÓ INSTITUT MAR D'INVESTIGACIONS MÈDIQUES (IMIM) (33.3%)

C/ Doctor Aiguader, 88

08003 Barcelona, ES;

BARDELLI, ALBERTO (33.3%) y

ARENA, SABRINA (33.3%)

72 Inventor/es:

BARDELLI, ALBERTO;

ARENA, SABRINA;

MONTAGUT VILADOT, CLARA;

ALBANELL MESTRES, JOAN;

ROVIRA GUERIN, ANA;

BELLOSILLO PARICIO, BEATRIZ y

DALMASES MASSEGÚ, ALBA

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 693 080 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 extracelular III del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico

- 5 La presente invención se refiere a nuevas mutaciones del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, como un marcador para la determinación de la respuesta al tratamiento con un anticuerpo monoclonal.

Antecedentes de la técnica

- 10 El gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor de cinasa de tirosina transmembranario que pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (familia ErbB), que incluye cuatro receptores de cinasa de tirosina estrechamente relacionados: el EGFR (ErbB-1), el HER2/c-neu (ErbB-2), el Her 3 (ErbB-3) y el Her 4 (ErbB-4). Tras la unión con el ligando, el EGFR activa las rutas de señalización intracelular, principalmente la cascada RAS-RAF-MEK-ERK y la ruta PI3K-AKT, que regulan unos acontecimientos oncológicos claves tales como la apoptosis, el crecimiento celular, la angiogénesis y la metástasis. Se ha notificado una activación aberrante o una sobreexpresión del EGFR en diversos tipos de cáncer (es decir, Mendelsohn J, Baselga J et al., " Epidermal growth factor receptor targeting in cancer". Semin Oncol - 2006, Vol. 33, págs.: 369-38). Se han descrito mutaciones imagen del EGFR en el cáncer de pulmón. Algunos ejemplos de dichas mutaciones se divulgan, por ejemplo, en el documento de TJ et al., "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib", N Engl J Med-2004, Vol. 350, págs.: 2129-2139.

El cáncer colorrectal metastásico (CCRm) es la segunda causa inmediata de muerte por cáncer en los países occidentales.

- 25 Una terapia basada en anticuerpos monoclonales (AcMc), por ejemplo, cetuximab y panitumumab, que están dirigidos contra el dominio extracelular III del EGFR, proporciona un beneficio de supervivencia significativo para los pacientes con CCRm, y ahora son los componentes convencionales de los regímenes terapéuticos de estos pacientes, es decir, tanto solos como junto con otro(s) fármaco(s) antineoplásico(s).

- 30 Los AcMc se unen a los antígenos foráneos expresados en las células cancerosas. Una vez unidos, las células cancerosas son marcadas para su destrucción por el sistema inmunitario del paciente. Además de su direccionamiento a las células cancerosas, los AcMc pueden estar diseñados para actuar sobre otros tipos de células y de moléculas necesarios para el crecimiento del tumor. Por ejemplo, los anticuerpos pueden neutralizar los factores de crecimiento e inhibir así la expansión del tumor. Es posible crear un AcMc específico para prácticamente cualquier objetivo extracelular/de la superficie de la célula (tal como en las células cancerosas). En resumen, los AcMc pueden usarse para destruir células tumorales malignas e impedir el crecimiento del tumor mediante el bloqueo de los receptores celulares específicos. Los AcMc terapéuticos cetuximab y panitumumab se unen al EGFR e impiden la activación de las rutas de señalización intracelular dirigidas por el EGFR (es decir, la cascada RAS-RAF-MEK-ERK y la ruta PI3K-AKT).

- No todos los pacientes con CCRm responden a un régimen terapéutico que comprende AcMc. La ausencia de respuesta de un paciente con CCRm a dicho tratamiento podría ser primaria (es decir, desde el comienzo del tratamiento con el AcMc anti-EGFR), lo que se conoce como resistencia primaria. Además, todos los pacientes con CCRm que inicialmente responden a los AcMc anti-EGFR invariablemente desarrollan una resistencia secundaria, es decir, una resistencia adquirida contra el AcMc anti-EGFR. En ambos casos, el resultado es un fracaso del tratamiento. Los mecanismos que contribuyen a la adquisición de dicha resistencia al tratamiento en los pacientes con CCRm todavía no se han comprendido en su totalidad.

- 50 El KRAS (también conocido como homólogo del oncogén vírico del sarcoma de rata de Kirsten V-Ki-ras2) es un efector del EGFR anterógrado y un marcador de la resistencia primaria a los AcMc anti-EGFR. El KRAS tiene un significativo impacto sobre la optimización del tratamiento en los pacientes con CCRm. El cuarenta por ciento de los tumores colorrectales portan una mutación en el gen KRAS, y estos pacientes no se benefician de los AcMc anti-EGFR. En la práctica clínica habitual, a todos los pacientes con CCRm que están siendo considerados para una terapia con AcMc anti-EGFR se les deberían realizar pruebas del KRAS, y los pacientes deberían ser excluidos de la terapia con cetuximab o panitumumab si se detecta una mutación del KRAS.

- Aunque el uso de las mutaciones del *KRAS* y más recientemente de las mutaciones del *NRAS* (homólogo del oncogén vírico Ras de neuroblastomas) como marcadores de la resistencia primaria a los AcMc anti-EGFR ha supuesto una etapa significativa hacia la optimización del tratamiento de los pacientes con CCRm, la comprensión de los cambios moleculares subyacentes en la resistencia adquirida a los AcMc anti-EGFR es actualmente un desafío crucial para mejorar el beneficio clínico de estos fármacos. Recientemente se han elucidado los mecanismos de resistencia secundaria (resistencia adquirida) en algunos pacientes. El acontecimiento más habitual es la aparición de mutaciones *KRAS* o una amplificación génica en aproximadamente el 50 % de los casos, como se deduce a partir de Misale et al., "Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in

colorectal cancer", Nature - 2012, Vol. nº 486, págs.: 532-536.

Otros mecanismos de resistencia secundaria incluyen la adquisición de una mutación en el dominio extracelular del EGFR que anula la unión del cetuximab al EGFR, según ilustran Montagut et al., "Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer", Nature Medicine - 2012, Vol. nº 18, págs.: 221-223. La mutación es el polimorfismo en la porción extracelular del gen *EGFR*, que da como resultado la sustitución de aminoácidos S492R en el dominio III de la proteína codificada.

Con el objetivo de estudiar la interacción del anticuerpo monoclonal con los epítomos del EGFR, numerosos informes están dirigidos al cartografiado de los epítomos críticos. Estos informes proporcionan datos de las mutaciones obtenidas por mutagénesis dirigida en el dominio III del EGFR. Un ejemplo de estos informes es el de Voigt et al., "Functional Dissection of the Epidermal Growth Factor Receptor Epitopes Targeted by Panitumumab and Cetuximab", Neoplasia - 2012, Vol. nº 14 (11), págs.: 1023-1031. Este documento desvela mutaciones en las que el aminoácido natural ha sido en su mayor parte cambiado por una alanina, según los protocolos y las herramientas de los ensayos de mutagénesis dirigida. Voigt concluye que los datos *in vitro* de la mutagénesis dirigida pueden no ser significativos *in vivo* debido a que podría ser que los residuos definidos como críticos para la unión del cetuximab o del panitumumab mediante una metodología de cribado de alanina estuvieran mutados *in vivo* en otros aminoácidos sin ninguna consecuencia funcional. Por lo tanto, esas posiciones clave en un epítomo definido identificado por la mutagénesis dirigida no sugieren una mutación significativa *in vivo* (el intercambio del aminoácido en particular).

La resistencia a los fármacos es por lo tanto un importante reto en los pacientes con cáncer colorrectal tratados con fármacos anti-EGFR, a saber, cetuximab y panitumumab. La elucidación de los mecanismos moleculares de resistencia representa un gran objetivo, pero esto implica la detección de mutaciones significativas o de otras alteraciones génicas como marcadores para la predicción de la respuesta y, al mismo tiempo, para la determinación de si un régimen médico en particular debe ser modificado debido a la resistencia adquirida (resistencia secundaria). En resumen, el estado de la técnica proporciona herramientas útiles para la detección de la resistencia primaria y secundaria a las terapias con AcMc anti-EGFR en pacientes con CCRm, pero es necesaria la identificación de biomarcadores adicionales y alternativos predictivos de la resistencia con objeto de tener en cuenta a los pacientes con diferentes mutaciones, o con una evolución diferente en los mecanismos de resistencia molecular.

30 Sumario de la invención

Los inventores han identificado nuevas mutaciones en el dominio extracelular del EGFR humano (dominio III) que se correlacionan con la resistencia al tratamiento con algunos de los AcMc usados en la terapia oncológica. Las mutaciones dan lugar a las sustituciones de aminoácidos de una arginina por una cisteína en la posición 451 de la proteína EGFR; de una serina por una leucina en la posición 464 del EGFR; de una glicina por una arginina en la posición 465 de la proteína EGFR; y de una lisina por una treonina en la posición 467 de la proteína EGFR.

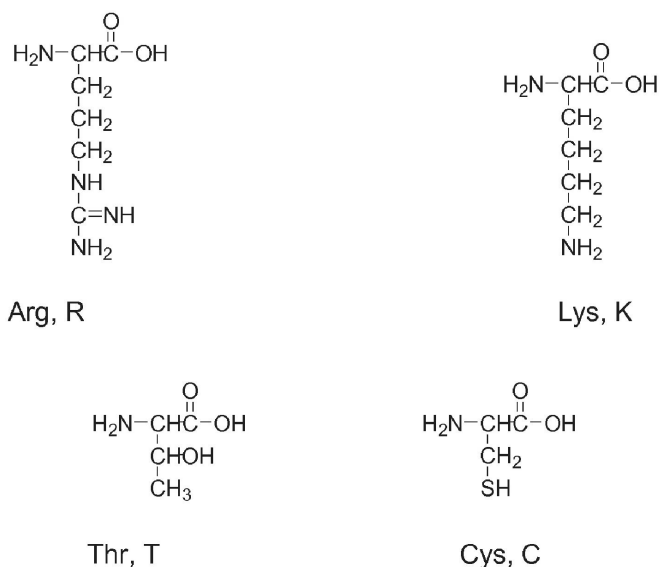
La proteína EGFR humana natural tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y las mutaciones se conocen en el presente documento como R451C, S464L, G465R y K467T. Las mutaciones pueden ser detectadas solas o junto con cada una de las otras en pacientes con CCRm después del tratamiento con un AcMc anti-EGFR.

Todas estas mutaciones están localizadas en un fragmento en particular de la secuencia de aminoácidos del epítomo de unión al cetuximab. A saber, están localizadas en un fragmento desde el aminoácido en la posición 450 hasta el aminoácido en la posición 470 de la SEQ ID NO: 2, esta SEQ ID NO: 2 se corresponde con la secuencia de aminoácidos consenso natural del EGFR humano. Este fragmento de la secuencia de aminoácidos del epítomo de unión al cetuximab es denominado también en el presente documento SEQ ID NO: 12 (LRSLKEISDGDVVISGNK~~N~~LC). De forma interesante, los inventores descubrieron que este fragmento incluye muchos de los intercambios de aminoácidos en particular (mutaciones) que dan lugar a un deterioro real (es decir, no hay eficacia) de muchos tratamientos con un AcMc anti-EGFR. Como se ha expuesto anteriormente, mediante mutagénesis se ha determinado que muchas posiciones de aminoácidos son posiciones clave mientras se cartografiaban los sitios de unión anti-EGFR-AcMc, no obstante, también se sabe que los ensayos de cartografiado no son concluyentes para la determinación de la resistencia a los tratamientos.

Por lo tanto, los inventores proporcionan por primera vez un fragmento del dominio extracelular III del EGFR que contiene o resume muchas mutaciones puntuales con un efecto real sobre la terapia. El análisis o la determinación de la secuencia de este fragmento (SEQ ID NO: 12) proporciona la ventaja de detectar muchos de los posibles pacientes resistentes a los tratamientos que incluyen un AcMc anti-EGFR. Algunos ejemplos de aminoácidos de esta SEQ ID NO: 12 (LRSLKEISDGDVVISGNK~~N~~LC) que dan lugar a una resistencia al ampliamente empleado AcMc anti-EGFR cetuximab están indicados en negrita y subrayados.

Todas estas mutaciones están localizadas en el exón 12 de la variante 1 del ARNm del gen *EGFR* humano que finalmente codifica la proteína EGFR de la SEQ ID NO: 2. Además, todas ellas están relacionadas con un cambio de los aminoácidos naturales por aminoácidos voluminosos (es decir, aquellos con una cadena lateral que consiste en hidrocarburos C1-C4 ramificados o no ramificados, opcionalmente con un grupo amino terminal) y/o por aminoácidos

polares o cargados. En particular, la mayor parte de las mutaciones se relacionan con un cambio en un aminoácido polar y/o cargado con una cadena lateral que comprende un amino terminal (-NH₂). Más en particular, dos de las mutaciones se relacionan con el cambio de un aminoácido con una cadena lateral que comprende un amino terminal (-NH₂). Además, las mutaciones R451C y K467T implican la sustitución de un aminoácido con una cadena lateral que comprende un amino terminal (-NH₂) por un aminoácido polar, cuya cadena lateral de carbohidrato comprende radicales con átomos del grupo del oxígeno, a saber -OH y -SH, y tienen un tamaño de la cadena lateral similar, según se representa a continuación:



10 Por lo tanto, los inventores proporcionan por primera vez la asociación de mutaciones en el dominio III del EGFR humano cambiando un aminoácido básico con una cadena lateral que comprende un amino terminal (-NH₂), con una probada resistencia al tratamiento con algunos de los AcMc usados en la terapia oncológica. Más particularmente, esta asociación se observa cuando estos aminoácidos básicos cambian por algunos aminoácidos polares seleccionados entre cisteína y treonina.

Además, los cambios de los aminoácidos en la anteriormente mencionada SEQ ID NO: 12, siendo dichos aminoácidos polares o neutros y estando sustituidos por aminoácidos voluminosos, con carga o neutros, también están asociados con una resistencia probada al tratamiento con algunos de los AcMc usados en la terapia oncológica. Este es el caso, por ejemplo, de la mutación S464L y de la mutación G465R.

Las mutaciones en particular R451C y K467T son detectadas en una proteína mutada que comprende la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO: 1.

25 Además, las mutaciones indicadas anteriormente y las mutaciones S464L y G465R son detectadas en una proteína mutada que comprende la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO: 13.

Estos marcadores pueden usarse después para seguir la evolución de los mecanismos de resistencia adquirida frente a las terapias anti-EGFR. La detección de la resistencia adquirida puede ser una herramienta útil para proponer otra metodología terapéutica o régimen médico junto con el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una secuencia peptídica con una longitud de entre 17 y 100 aminoácidos y que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13

35
$$\text{X}^1\text{SLKEISDGDVIX}^4\text{X}^5\text{NX}^2,$$

en la que

X¹ se selecciona entre R y C;
X⁴ se selecciona entre S y L;
40 X⁵ se selecciona entre G y R;
X² se selecciona entre K y T; y en la que al menos uno de X¹, X⁴, X⁵ y X² es, respectivamente, C, L, R o T.

La SEQ ID NO: 13 engloba cualquiera de las mutaciones definidas anteriormente, pero al menos una de ellas: R451C, S464L, G465R o K467T.

45

En una realización en particular, la invención se refiere a una secuencia peptídica con una longitud de entre 17 y 100 aminoácidos y que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1

X¹SLKEISDGDVIISGNX²,

5 en la que:

X¹ se selecciona entre R y C;
X² se selecciona entre K y T; y

10 en la que si X¹ es C, entonces X² se selecciona independientemente entre K y T, y si X¹ es R, entonces X² es T.

La SEQ ID NO: 1 engloba cualquiera de las mutaciones definidas anteriormente, pero al menos una de ellas: R451C o K467T. En otras palabras, X¹ y X² tienen el significado indicado, pero con la condición de que al menos uno de X¹ o

15 X² sean, respectivamente, las formas mutadas C o T; o ambas X¹ y X² sean las formas mutadas C y T. Esta SEQ ID NO: 1 deriva de la proteína humana EGFR de la SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, es un fragmento de la secuencia de proteínas humana, incluyendo dicho fragmento al menos una de las mutaciones indicadas. Por lo tanto, el resto de los aminoácidos hasta 100 son aquellos que están localizados en la secuencia de proteínas de la SEQ ID NO: 2, siendo cualquiera de los flanqueantes dicha SEQ ID NO: 1 o una secuencia unida al extremo C

20 terminal de la SEQ ID NO: 1 y definido por el aminoácido X².

Ventajosamente, estas mutaciones (R451C, S464L, G465R o K467T) representan alternativas que pueden ensayarse en una muestra de un sujeto sospechoso de haber adquirido resistencia o una resistencia primaria a las terapias con AcMc anti-EGFR. Por lo tanto, además de otras mutaciones que pueda haber presentes o no en la

25 muestra de un sujeto, las mutaciones propuestas en la SEQ ID NO: 1 (R451C o K467T) o incluso en la SEQ ID NO: 13 (R451C, S464L, G465R o K467T) sirven para la detección de posibles sujetos resistentes no detectables por otros medios. En particular, las mutaciones R451C y K467T implican la ventaja adicional de indicar que algunas de las terapias con AcMc anti-EGFR todavía son permisivas (o eficaces). En particular, las mutaciones R451C y K467T son permisivas al panitumumab. Esto significa que, si se detecta al menos una de estas dos mutaciones, al menos

30 puede recomendarse el tratamiento con panitumumab.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un oligonucleótido que comprende una secuencia que codifica la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13.

35 El péptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13 es el producto clave que da lugar a la detección de las formas mutadas de la proteína EGFR, de gran interés en el campo de la terapia oncológica. Estas formas mutadas de la proteína también son detectables en forma de un oligonucleótido que comprende una secuencia que codifica la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13.

40 Los oligonucleótidos que codifican la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13 son aquellos que incluyen los cambios de nucleótidos que dan lugar a al menos uno de los cambios de aminoácidos mencionados anteriormente, teniendo en cuenta la degeneración de los codones (la redundancia del código genético) en estas posiciones de mutación. Estos oligonucleótidos pueden usarse entonces como sondas de hibridación para la detección de las mutaciones en particular que dan lugar a cambios de aminoácidos.

45 Además, todos estos oligonucleótidos son sondas adecuadas que permiten la detección de la presencia o no de las mutaciones de nucleótidos que dan lugar a los cambios de aminoácidos en una secuencia peptídica que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13.

50 En particular, la invención se basa en la sorprendente identificación de las sustituciones de aminoácidos de una arginina por una cisteína en la posición 451 de la proteína EGFR; de una serina por una leucina en la posición 464 del EGFR; de una glicina por una arginina en la posición 465; y de una lisina por una treonina en la posición 467 de la proteína EGFR.

55 El cambio de aminoácidos K467T es el resultado del cambio de nucleótidos A→C en el nucleótido 1400 (también conocido en el presente documento como A1400C) de la variante 1 del ARNm del gen *EGFR* (el codón AAA es cambiado por ACA). El cambio de aminoácidos R451C es el resultado del cambio de nucleótidos C→T en el nucleótido 1351 (también conocido en el presente documento como C1351T) de la variante 1 del ARNm del gen *EGFR* (el codón CGC es cambiado por TGC). El cambio de aminoácidos S464L es el resultado del cambio de nucleótidos C→T en el nucleótido 1391 (también conocido en el presente documento como C1391T) de la variante 1 del ARNm del gen *EGFR* (el codón TCA es cambiado por TTA). El cambio de aminoácidos G465R es el resultado del cambio de nucleótidos G→A en el nucleótido 1393 (también conocido en el presente documento como G1393A) de la variante 1 del ARNm del gen *EGFR* (el codón GGA es cambiado por AGA).

65 Todos estos cambios de aminoácidos pueden ser el resultado de otras mutaciones en el codón que los codifica. En

particular, todos aquellos cambios de nucleótidos que dan lugar a una cisteína en la posición 451 de la SEQ ID NO: 2 (proteína EGFR humana), a una leucina en la posición 464 de la SEQ ID NO: 2, a una arginina en la posición 465 de la SEQ ID NO: 2; y a una treonina en la posición 467 de la SEQ ID NO: 2.

- 5 Como ya se ha indicado anteriormente, cada uno de los anteriores cambios de nucleótidos se refiere al ARNm, la variante del transcrito 1 de la secuencia del gen *EGFR* (también conocido como ERBB1, PIG61, protooncogén c-ErbB-1, tirosina cinasa de proteína del receptor homólogo del oncogén vírico de la leucemia eritroblástica aviar (v-erb-b) erbB-1 o HER1). La secuencia del ARNm, la variante del transcrito 1, del gen *EGFR* es la correspondiente a la SEQ ID NO: 3 (o número de registro del GenBank NM_005228.3, versión 3 de secuencia y edición de la base de
- 10 datos disponible el 18.05.2014), así como cualquier variante de la misma, en el que dicha variante codifica la proteína EGFR. La proteína EGFR se corresponde con la SEQ ID NO: 2 (número de registro del GenBank NP_005219.2 versión 2 de secuencia y edición de la base de datos del 18.05.2014) o cualquier variante de la misma que mantenga la estructura básica de la proteína EGFR. Las SEQ ID NOs: 2 y 3 son humanas (*Homo sapiens*). No obstante, el EGFR está muy conservado en la mayoría de los mamíferos y las mutaciones puntuales del presente documento comprenden las secuencias naturales, los mismos aminoácidos en la mayoría de los mamíferos. Por lo
- 15 tanto, la invención engloba las mismas mutaciones, pero determinadas en una secuencia de la proteína o del gen EGFR de cualquier mamífero.

Otro aspecto de la invención es un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID Nos: 6

20 (CAAAGTTTTCAGGGATACATTGTTTTT) y 7 (TTAAATGGGAATAGCCCTTCAATATT).

- Este conjunto de cebadores permite la amplificación de la región genómica que comprende la porción de la región codificante del *EGFR* en la que se localizan los cambios de nucleótidos que dan como resultado las mutaciones de la presente invención. Por lo tanto, están relacionados con las nuevas mutaciones de aminoácidos identificadas por
- 25 los inventores y permiten la amplificación de la región codificante del EGFR que codifica el fragmento denominado en el presente documento SEQ ID NO: 12 (LRSLKEISDGDVVISGNKSLC) que se ha encontrado sorprendentemente como una región clave que incluye muchas mutaciones que dan lugar a una resistencia (adquirida o primaria) al tratamiento con AcMc anti-EGFR. Particularmente, el conjunto de cebadores que consiste en la SEQ ID NO: 6 y 7 permite la amplificación de la región codificante del EGFR que da lugar al exón 12 en la variante 1 del transcrito del
- 30 ARNm. Este conjunto permite determinar si las mutaciones R451C, S464L, G465R y K467T están presentes en la proteína EGFR resultante final. Más en particular, si las mutaciones R451C y K467T están presentes en la proteína EGFR resultante final.

Otro aspecto de la invención es un kit que comprende un conjunto de cebadores que consiste en: el conjunto de

35 cebadores de las SEQ ID NOs: 6 y 7 y/o un oligonucleótido según se define en el segundo aspecto de la invención.

- Este kit es una herramienta utilizable para detectar la presencia de las mutaciones (R451C, S464L, G465R y K467T) de la SEQ ID NO: 13 y más particularmente de las mutaciones R451C y K467T de las SEQ ID NOs: 1, o de cualquier
- 40 secuencia de aminoácidos que las comprenda, de una forma fácil y rápida, dado que incluye los cebadores para la amplificación de las regiones del gen EGFR que pueden incluir las mutaciones divulgadas que se correlacionan con la resistencia al tratamiento con cetuximab.

También, otro aspecto de la invención es, por lo tanto, el kit como se ha definido anteriormente, para su uso en la predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende anticuerpos monoclonales anti-

45 EGFR. O el uso de un kit como se ha definido anteriormente para predecir la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende anticuerpos monoclonales anti-EGFR.

Además, la invención también se refiere a un método *in vitro* para predecir la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab, en el que el método comprende:

50

- (i) la determinación en una muestra tomada del sujeto y mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas, de si hay mutaciones presentes o ausentes en un fragmento definido por la SEQ ID NO: 12, que es un fragmento desde el aminoácido 450 hasta el aminoácido 470 de la secuencia de aminoácidos consenso natural del EGFR humano de la SEQ ID NO: 2; y
- 55 ii) la correlación de la presencia de cualquier mutación identificada en la etapa i) con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o la correlación de la ausencia de mutaciones en la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.

Por lo tanto, la SEQ ID NO: 12 se corresponde con el fragmento (o la secuencia) del aminoácido natural del EGFR humano, y las mutaciones relacionadas con esta secuencia de aminoácidos consenso natural están determinadas en esta SEQ ID NO: 12, que se ha descubierto como un fragmento significativo fragmento del EGFR en relación con la predicción de los tratamientos con AcMc anti-EGFR. Esta SEQ ID NO: 12 también forma parte de la invención (LRSLKEISDGDVVISGNKSLC) como un péptido aislado.

60

La invención también se refiere a métodos *in vitro* de predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen

65

terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab, en el que el método comprende:

- 5 i) la determinación mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas, de la presencia o la ausencia de al menos uno de los siguientes aminoácidos:
 una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, una leucina en la posición 464 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, una arginina en la posición 465 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, en una muestra tomada del sujeto; y
 10 ii) la correlación de la presencia de cualquiera de los aminoácidos identificados en la etapa i) con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o la correlación de la ausencia de todos estos aminoácidos en la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.

Además, la invención también se refiere, en una realización en particular, a un método *in vitro* de predicción de la
 15 respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab, en el que el método comprende:

- 20 i) la determinación mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas, de la presencia o la ausencia de al menos uno de los siguientes aminoácidos:
 una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, en una muestra tomada del sujeto; y
 25 ii) la correlación de la presencia de cualquiera de los aminoácidos identificados en la etapa i) con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o la correlación de la ausencia de todos estos aminoácidos en la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.

Este método *in vitro* engloba la detección de si, en el exón 12 de la variante 1 del ARNm del gen *EGFR* humano que finalmente codifica la proteína EGFR de la SEQ ID NO: 2, hay un cambio de nucleótidos que da lugar a un cambio
 30 de un aminoácido con una cadena lateral que comprende un amino terminal (-NH₂) en el gen natural por un aminoácido polar, cuya cadena lateral de carbohidrato comprende radicales con átomos del grupo del oxígeno.

La puesta en práctica del método *in vitro* de predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab, implica la ventaja de acomodar la terapia más adecuada para el sujeto y
 35 evita metodologías erróneas o no lo suficientemente útiles terapéuticamente que producen una pérdida de tiempo, lo que es un aspecto esencial para el sujeto y para el éxito del tratamiento, especialmente si el sujeto está afectado por cáncer.

Además, la detección de cualquiera de estas mutaciones permite determinar si se ha desarrollado una resistencia
 40 secundaria al tratamiento con cetuximab en el sujeto, no portando inicialmente dicho sujeto las mutaciones en el gen *EGFR*.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es un método *in vitro* para la determinación de la resistencia adquirida a un
 45 régimen terapéutico que comprende cetuximab, método que comprende:

- i) la determinación mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o
 métodos de secuenciación de proteínas, de la presencia o la ausencia de al menos uno de los siguientes
 50 aminoácidos:
 una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, una leucina en la posición 464 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, una arginina en la posición 465 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, en una muestra tomada del sujeto; y
 ii) la correlación de la presencia de cualquiera de los aminoácidos identificados en la etapa i) con la resistencia
 55 adquirida del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o la correlación de la ausencia de todos estos aminoácidos en la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.

Este método *in vitro* para la determinación de la resistencia adquirida en un sujeto después de un tratamiento con
 60 cetuximab permite ventajosamente suspender el tratamiento y además evitar efectos adversos secundarios o colaterales del cetuximab.

Además, pueden iniciarse otras metodologías lo más rápido posible.

Como antes, este método *in vitro* para la determinación de la resistencia adquirida engloba la detección de si en el
 65 exón 12 de la variante 1 del ARNm del gen *EGFR* humano que finalmente codifica la proteína EGFR de la SEQ ID

NO: 2 hay un cambio de nucleótidos que da lugar a un cambio de un aminoácido con una cadena lateral que comprende un amino terminal (-NH₂) en el gen natural por un aminoácido polar, cuya cadena lateral de carbohidrato comprende radicales con átomos del grupo del oxígeno. Este método *in vitro* también engloba la detección de si al menos en el exón 12 de la variante 1 del ARNm del gen EGFR humano que finalmente codifica el fragmento de la

5 proteína EGFR de la SEQ ID NO: 12, hay un cambio de nucleótidos que da lugar a un cambio de aminoácidos naturales por aminoácidos voluminosos (es decir, aquellos con una cadena lateral que consiste en hidrocarburos C1-C4 ramificados o no ramificados, opcionalmente con un grupo amino terminal) y/o por aminoácidos polares o cargados. El aminoácido natural se refiere al aminoácido según la secuencia consenso de aminoácidos de la proteína EGFR humana (SEQ ID NO: 2).

10

Otro aspecto de la invención es un método *in vitro* de identificación, en una muestra tomada de un sujeto, de la presencia o la ausencia de una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una leucina en la posición 464 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una arginina en la posición 465 de la

15 secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, método que comprende la determinación de la secuencia de la SEQ ID NO: 2, al menos desde la posición 450 hasta la posición 470.

Este último aspecto también puede formularse como un método *in vitro* de identificación, en una muestra tomada de un sujeto, de la presencia o la ausencia de una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una leucina en la posición 464 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una arginina en la posición 465 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2,

20 método que comprende la determinación del aminoácido en las posiciones 451 y/o 464 y/o 465 y/o 467 mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas.

Breve descripción de los dibujos

30

La FIG. 1 es la gráfica de dos visualizaciones de los resultados de la secuenciación obtenidos mediante una secuenciación convencional de Sanger (gráfica A) y una plataforma de secuenciación de siguiente generación (NGS) 454 GS Junior (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) (gráfica B). Muestra la adquisición de mutaciones en el ectodominio del EGFR después del tratamiento con cetuximab en dos muestras. (A) En el

35 paciente #31, la muestra tumoral posterior al tratamiento había adquirido una sustitución A -> C en el nucleótido 1400 del gen *EGFR* que no estaba presente en una biopsia previa al tratamiento, causando una sustitución de una lisina por una treonina en el aminoácido 467 (K467T). (B) En el paciente #35 se detectó una sustitución C -> T en el nucleótido 1351 del gen *EGFR* en la muestra posterior al tratamiento, dando lugar a una sustitución de una arginina por una cisteína en el aminoácido 451 (R451C).

40

La FIG. 2 es el análisis mediante una citometría de flujo de la unión de NIH3T3 tripsinizadas que sobreexpresan el EGFR natural (EGFR natural) y la K467T del EGFR mutante incubado con cetuximab (FIG. 2A) o con panitumumab (FIG. 2B) como anticuerpos primarios, y usando un anticuerpo secundario conjugado con ficoeritrina dirigido contra la IgG humana. C significa recuento; FL2H representa la intensidad máxima de la señal

45 en el segundo canal de detección de fluorescencia con un paso de banda de 585 ± 21 que se usa para detectar la fluorescencia de la ficoeritrina (PE); E significa vacío.

La FIG. 3 es también un análisis de la unión mediante citometría de flujo de NIH3T3 tripsinizadas que sobreexpresan el EGFR natural (EGFR natural) y la S464L del EGFR mutante incubado con cetuximab (FIG. 3A) o con panitumumab (FIG. 3B) como anticuerpos primarios, y usando un anticuerpo secundario conjugado con ficoeritrina dirigido contra la IgG humana. C significa recuento; FL2H representa la intensidad máxima de la señal

50 en el segundo canal de detección de fluorescencia con un paso de banda de 585 ± 21 que se usa para detectar la fluorescencia de la ficoeritrina (PE); E significa vacío.

La FIG. 4 muestra un análisis mediante una citometría de flujo de la unión de NIH3T3 tripsinizadas que sobreexpresan el EGFR natural (EGFR natural) y la G465R del EGFR mutante incubado con cetuximab (FIG. 4A) o con panitumumab (FIG. 4B) como anticuerpos primarios, y usando un anticuerpo secundario conjugado con ficoeritrina dirigido contra la IgG humana. C significa recuento; FL2H representa la intensidad máxima de la señal

55 en el segundo canal de detección de fluorescencia con un paso de banda de 585 ± 21 que se usa para detectar la fluorescencia de la ficoeritrina (PE); E significa vacío.

Descripción detallada de la invención

En general, las siguientes palabras o frases tienen la definición indicada cuando se usan en la descripción, los

65 ejemplos y las reivindicaciones.

El término "régimen terapéutico" según se usa en el estado de la técnica y también en el presente documento, se refiere a cualquier terapia destinada a impedir, ralentizar, detener o revertir el crecimiento de una lesión precancerosa, de un cáncer o de una metástasis cancerosa. Incluye la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia, la terapia con anticuerpos monoclonales u otros métodos.

5 Por "respuesta" debe entenderse cualquier tipo de mejora tanto clínica como no clínica seleccionada entre, pero no se limita a, una reducción apreciable en el tamaño del tumor o en las evidencias de enfermedad o de la progresión de la enfermedad, una enfermedad estable, un aumento o una prolongación de la supervivencia sin progresión o de la reducción en la toxicidad.

10 "Supervivencia sin progresión" indica la cantidad de tiempo durante y después del tratamiento en la que el cáncer no crece. La supervivencia sin progresión incluye la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado una enfermedad estable.

15 "Una respuesta completa" a una terapia define a los pacientes con una enfermedad valorable pero no apreciable, cuyo tumor y cualquier signo de enfermedad ha desaparecido.

"Una respuesta parcial" a una terapia define a los pacientes con cualquier cosa menor que una respuesta completa.

20 "Un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (AcMc anti-EGFR)" se refiere a un anticuerpo monoclonal y a un fragmento del mismo que son capaces de reconocer los epítomos de la secuencia proteica del EGFR. Los AcMc aprobados que reconocen diferentes epítomos del EGFR son cetuximab y panitumumab, pero podrían usarse otros AcMc en el régimen terapéutico para afrontar el cáncer divulgado en la presente invención. Algunos fragmentos de anticuerpos adecuados incluyen F(ab), F(ab'), Fv y nanocuerpos, entre otros.

La expresión "métodos de genotipado" incluye todas aquellas metodologías y procesos adecuados para la determinación de genotipo o, lo que es lo mismo, para la identificación del nucleótido en una posición dada. Algunos ejemplos de dichas metodologías engloban la secuenciación de Sanger, la pirosecuenciación, la PCR específica de alelos, la cromatografía líquida desnaturalizante a alta presión (DHPLC), la extensión de cebadores específicos de alelos (ASPE), los biochips/micromatrices de ADN y la hibridación dinámica específica de alelo (DASH).

30 Por "métodos de secuenciación de proteínas" debe entenderse cualquier técnica que permita la determinación de la secuencia de aminoácidos de una proteína, así como la conformación que adopta la proteína y la magnitud en la que está complejada con cualquier molécula no peptídica. La determinación de la composición de aminoácidos puede llevarse a cabo mediante una hidrólisis o la separación de los aminoácidos. Algunas tecnologías conocidas incluyen la secuenciación de Sanger, la degradación de Edman y la espectrometría de masas.

40 Si no se indica lo contrario, todas las secuencias relativas al gen *EGFR*, la variante del ARNm y la proteína EGFR se refieren a las humanas, estando los números de registro de la base de datos recogidos a lo largo de la descripción. También, si no se indica lo contrario, las secuencias de oligonucleótidos se muestran en la dirección 5'-3' y las secuencias peptídicas se muestran partiendo del aminoácido N terminal ((conocido también como el amino terminal, el NH₂ terminal, el extremo N terminal y el amino terminal) del péptido, según la convención para la escritura de secuencias peptídicas.

45 Todas las secuencias de aminoácidos, así como las de oligonucleótidos, pueden ser sintetizadas siguiendo la apropiada síntesis química de péptidos o de oligonucleótidos. Algunos ejemplos de síntesis peptídica incluyen síntesis en fase sólida y síntesis en fase líquida, acoplando ambos procesos el grupo carboxilo o C terminal de un aminoácido al grupo amino o N terminal de otro. Las reacciones no deseadas se evitan en la síntesis en fase sólida usando grupos protectores, tales como 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) y terc-butiloxycarbonilo (t-Boc). Alternativamente, los péptidos pueden obtenerse mediante tecnologías de ADN recombinante. Los oligonucleótidos pueden obtenerse mediante una síntesis en fase sólida usando el método del fosforamidito y bloques de construcción de fosforamidito derivados de 2'-desoxinucleósidos protegidos (dA, dC, dG y T), de ribonucleósidos (A, C, G y U) o de nucleósidos modificados químicamente. Los oligonucleótidos también pueden derivar de la digestión del ADN con las enzimas de restricción apropiadas.

60 Como ya se ha explicado anteriormente, las enseñanzas de la técnica anterior muestran que las mutaciones en el dominio III del EGFR pueden ayudar a localizar puntos críticos para la interacción de los AcMc (cetuximab y/o panitumumab). No obstante, estos datos pueden servir para detectar epítomos específicos, pero no son concluyentes en términos de resistencia al tratamiento, dado que únicamente unos intercambios de aminoácidos específicos engloban esta información (la de la resistencia, tanto la resistencia primaria como la secundaria). Particularmente, la resistencia adquirida al tratamiento es de gran importancia con objeto de modificar las metodologías terapéuticas y evitar la pérdida de tiempo y de esfuerzo.

65 La presente invención está basada en nuevas mutaciones en la región codificante del gen *EGFR*. Las nuevas

mutaciones de la presente invención son útiles para predecir la respuesta a la terapia basada en AcMc de un paciente con CCRm. En particular, son útiles para predecir la resistencia primaria y la aparición de una resistencia secundaria.

- 5 Como ya se ha indicado anteriormente, cada uno de los cambios de nucleótido divulgados da lugar a la sustitución por una cisteína en la posición 451 de la SEQ ID NO: 2 (proteína humana del EGFR), por una leucina en la posición 464 de la SEQ ID NO: 2, por una arginina en la posición 465 de la SEQ ID NO: 2 y por una treonina en la posición 467 de la SEQ ID NO: 2. Todas estas mutaciones en particular están localizadas en un fragmento entre el aminoácido 450 y el aminoácido 470 de esta SEQ ID NO: 2, denominándose dicho fragmento en el presente documento, la SEQ ID NO: 12.

El péptido según la invención, con una longitud de entre 17 y 100 aminoácidos y que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 incluye cualquiera de las mutaciones R451C o K467T.

- 15 En una realización en particular, este péptido se selecciona entre el grupo que consiste en: una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 1 en la que X¹ es R y X² es T; una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 1 en la que X¹ es C y X² es T; y una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 1 en la que X¹ es C y X² es K.

- En una realización más en particular, el péptido consiste en la SEQ ID NO: 1 y, más particularmente en la SEQ ID NO: 1 seleccionado entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 en la que X¹ es R y X² es T; la SEQ ID NO: 1 en la que X¹ es C y X² es T; y la SEQ ID NO: 1 en la que X¹ es C y X² es K. Estas secuencias están representadas por la SEQ ID NO: 8 (RSLKEISDGDVVISGNT), la SEQ ID NO: 9 (CSLKEISDGDVVISGNT) y la SEQ ID NO: 10 (CSLKEISDGDVVISGNTK).

- 25 En una realización en particular, el péptido con una longitud de entre 17 y 100 aminoácidos y que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, comprende adicionalmente la SEQ ID NO: 4

NLCYANTINWKKLFGTSGGKTKIIX³,

en la que

- 30 X³ se selecciona entre S y R.

- El péptido que comprende tanto la SEQ ID NO: 1 como la SEQ ID NO: 4 se corresponde, en una realización en particular, con una secuencia continua de aminoácidos partiendo de la SEQ ID NO: 1. Esta secuencia tiene 42 aminoácidos y se corresponde con un fragmento de la proteína EGFR codificada parcialmente por el exón 12 del gen *EGFR*. Está representada por, o consiste en, la SEQ ID NO: 5 (X¹SLKEISDGDVVISGNX²NLCYANTINWKKLFGTSGGKTKIIX³)

- En otra realización en particular, el péptido con una longitud de entre 17 y 100 aminoácidos y que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13, comprende adicionalmente la SEQ ID NO: 4. Este péptido que comprende tanto la SEQ ID NO: 13 como la SEQ ID NO: 4 se corresponde, en una realización en particular, con una secuencia continua de aminoácidos partiendo de la SEQ ID NO: 13. Tiene 42 aminoácidos y se corresponde con un fragmento de la proteína EGFR codificado parcialmente por el exón 12 del gen *EGFR*. Está representado por, o consiste en, la SEQ ID NO: 14 (X¹SLKEISDGDVVISX⁴X⁵NX²NLCYANTINWKKLFGTSGGKTKIIX³)

- 45 De hecho, esta SEQ ID NO: 5 incluye cualquiera o todas las mutaciones R451C y K467T, y adicionalmente engloba la opción de incluir la mutación S492R. Por lo tanto, X¹, X² y X³ tienen los mismos significados a los indicados anteriormente; y si X¹ es C, entonces X² se selecciona independientemente entre K y T, y si X¹ es R, entonces X² es T.

- 50 La mutación S492R fue divulgada por primera vez por los inventores Montagut et al., (*supra*) como una mutación clave para la determinación también de la resistencia a los AcMc en cánceres, incluyendo el cáncer colorrectal metastásico.

- Además, la SEQ ID NO: 14 incluye cualquiera o todas las mutaciones R451C, S464L, G465R y K467T, y adicionalmente engloba la opción de incluir la mutación S492R. Por lo tanto, X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ tienen los mismos significados a los indicados anteriormente, pero al menos uno de X¹, X², X⁴ o X⁵ es, respectivamente, C, L, R o T.

- En otra realización en particular, la secuencia peptídica que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13 tiene una longitud de entre 17 y 50 aminoácidos. En otra realización en particular, tiene una longitud de entre 17 y 25 aminoácidos (esto es 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25). En otra realización aún más en particular, la secuencia peptídica tiene una longitud de 17 aminoácidos. En otra realización en particular tiene una longitud de 21 aminoácidos, estando cualquiera de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13 flanqueada en el extremo N terminal por una leucina (L) y en el extremo C terminal por el tripéptido N-Asparagina-Leucina-Cisteína-C (abreviado como NLC)

- 65 Además, y como se representará en los siguientes ejemplos, los inventores también han detectado una nueva

mutación que da lugar a una resistencia a los AcMc en cánceres, incluyendo el cáncer colorrectal metastásico, a saber, un cambio de una isoleucina por una metionina en la posición 491 de la SEQ ID NO: 2 (la proteína humana EGFR). Esta mutación se denomina en el presente documento I491M. El cambio de aminoácido I491M es el resultado del cambio de nucleótidos A→G en el nucleótido 1473 (conocido también en el presente documento como 5 A1473G) de la variante 1 del ARNm del gen *EGFR* (el codón ATA es cambiado por ATG)

Las nuevas mutaciones identificadas en la presente invención son alternativas, pero también pueden usarse en combinación para asegurar una apropiada selección de la terapia.

- 10 La invención engloba oligonucleótidos que codifican la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13. En la realización en particular de un oligonucleótido que codifica la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13, opcionalmente junto con cualquier realización anterior o posterior, dicho oligonucleótido codifica adicionalmente la SEQ ID NO: 4, y por lo tanto en otra realización en particular, el oligonucleótido codifica la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 14. Algunos oligonucleótidos en particular son aquellos que consisten en las secuencias de nucleótidos que codifican cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 8 hasta 10. Estos oligonucleótidos, como se ha expuesto anteriormente, pueden usarse como sondas de hibridación para la detección de las mutaciones.

El kit según la invención comprende, además del conjunto de cebadores divulgado anteriormente, sondas oligonucleotídicas para la detección de las formas naturales o mutadas del gen *EGFR* que codifica cualquiera de las mutaciones R451C y K467T. Algunos ejemplos de estas sondas para la detección de las formas mutadas del gen *EGFR* consisten en oligonucleótidos seleccionados entre aquellos que codifican cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 5, 8, 9 y 10.

Las sondas consistentes en los oligonucleótidos seleccionados entre aquellos que codifican cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 5, 8, 9 y 10 son secuencias de nucleótidos que comprenden las diversas opciones de la degeneración de los codones en los correspondientes puntos de mutación.

Algunas sondas en particular para la detección de la mutación R451C son aquellas complementarias de la región mutada del *EGFR* en la que se localizan los cambios en los nucleótidos que dan como resultado la mutación R451C de la presente invención, siendo tanto la región codificante como la complementaria del gen. Por lo tanto, hibridan con un fragmento de la secuencia de nucleótidos portador de la mutación, y permiten la detección del cambio de nucleótido C→T en la posición 1351, divulgado anteriormente.

Algunas sondas en particular para la detección de la mutación K467T son aquellas complementarias de la región mutada del *EGFR* en la que se localizan los cambios en los nucleótidos que dan como resultado la mutación K467T de la presente invención, siendo tanto la región codificante como la complementaria del gen. Por lo tanto, hibridan con un fragmento de la secuencia de nucleótidos portador de la mutación, y permiten la detección del cambio de nucleótido A→C en la posición 1400, divulgado anteriormente.

Otras sondas oligonucleotídicas en particular del kit son para la detección de las formas naturales o mutadas del gen *EGFR* que codifica cualquiera de las mutaciones S464L y G465R.

Algunas sondas en particular para la detección de la mutación S464L son aquellas complementarias de la región mutada del *EGFR* en la que se localizan los cambios en los nucleótidos que dan como resultado la mutación S464L de la presente invención, siendo tanto la región codificante como la complementaria del gen. Por lo tanto, hibridan con un fragmento de la secuencia de nucleótidos portador de la mutación, y permiten la detección del cambio de nucleótido C→T en la posición 1391, divulgado anteriormente.

Otras sondas en particular para la detección de la mutación G465R son aquellas complementarias de la región mutada del *EGFR* en la que se localizan los cambios en los nucleótidos que dan como resultado la mutación G465R de la presente invención, siendo tanto la región codificante como la complementaria del gen. Por lo tanto, hibridan con un fragmento de la secuencia de nucleótidos portador de la mutación, y permiten la detección del cambio de nucleótido G→A en la posición 1393, divulgado anteriormente.

Por "secuencia de nucleótidos portadora de la mutación" debe entenderse cualquiera de las cadenas de ADN codificantes o complementarias de la estructura genómica del ADN, así como una cadena de ARNm que va a ser traducida.

Los kits de la invención pueden comprender, además, opcionalmente junto con cualquier realización anterior o posterior, reactivos adicionales para la detección de mutaciones en los genes *KRAS* y/o *PIK3CA* y/o *BRAF* y/o mutaciones adicionales en el gen *EGFR*. Estos reactivos incluyen cebadores específicos para la detección de mutaciones en particular en todos estos genes, y particularmente las mutaciones asociadas con la resistencia a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab.

Otros reactivos incluidos en el kit están relacionados con las sondas oligonucleotídicas que pueden hibridar con las

formas tanto naturales como mutadas de todos esos genes.

Por lo tanto, en una realización en particular, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el kit comprende herramientas y medios (reactivos) para detectar las mutaciones en KRAS seleccionadas entre el grupo que consiste en G12A; G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13A; G13C, G13D; G13V según se define en Karapetis et al., "K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer", The New England Journal of Medicine - 2008, Vol. 359, págs.: 1757-1765. Todas estas mutaciones están ubicadas en los codones 12 y 13 de la secuencia de la proteína K-ras identificada con el número de registro del GenBank NP_004976.2 del 24.07.2011 (denominado precursor de la isoforma b del KRAs de la GTPasa) y NP_203524.1 del 24.07.2011 (denominado precursor de la isoforma a del KRAs de la GTPasa). En otra realización preferida, el kit comprende reactivos para la detección de mutaciones en los exones 9 y 20 del gen PIK3CA que codifica la proteína PIK3CA con el número de registro del GenBank NP_006209.2 del 17.07.2011; y/o la mutación V600E ubicada en el codón 600 de la secuencia de proteínas del BRAF identificada con el número de registro del GenBank NP_004324.2 del 24.07.2011. En otra realización, preferida el kit comprende medios (reactivos) para la detección de la mutación S492R en la proteína EGFR de la SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, el kit comprende medios (reactivos) para la detección de la mutación I491M en la proteína EGFR de la SEQ ID NO: 2.

Los kits de la invención son para su uso, en particular, en la predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende anticuerpos monoclonales anti-EGFR, en particular cetuximab y/o panitumumab. Más particularmente, el sujeto está afectado por cáncer, y el cáncer es cáncer colorrectal metastático.

La invención se refiere, según un aspecto de la invención, a un método *in vitro* para la predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab, en el que el método comprende:

(i) la determinación en una muestra tomada del sujeto y mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas, de si hay mutaciones presentes o ausentes en un fragmento definido por la SEQ ID NO: 12, que es un fragmento entre el aminoácido 450 y el aminoácido 470 de la secuencia de aminoácidos natural consenso del EGFR humano de la SEQ ID NO: 2; y ii) la correlación de la presencia de cualquier mutación identificada en la etapa i) con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o la correlación de la ausencia de mutaciones en la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.

En una realización en particular del método *in vitro*, en la etapa (i) se determina si en la SEQ ID NO: 12 están presentes o ausentes al menos una de las siguientes mutaciones: un cambio de una arginina por una cisteína en la correspondiente posición 451 de la SEQ ID NO:2; una serina por una leucina en la correspondiente posición 464 de la SEQ ID NO: 2; una glicina por una arginina en la correspondiente posición 465 de la SEQ ID NO: 2; y una lisina por una treonina en la correspondiente posición 467 de la SEQ ID NO: 2.

En otra realización en particular, el método *in vitro* para la predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab comprende:

i) la determinación mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas, de la presencia o la ausencia de al menos uno de los siguientes aminoácidos:
una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, en una muestra tomada del sujeto; y ii) la correlación de la presencia de cualquiera de los aminoácidos identificados en la etapa i) con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o la correlación de la ausencia de todos estos aminoácidos de la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.

Esta realización en particular engloba la determinación de si la SEQ ID NO: 1 está presente en la muestra del sujeto y la correlación además en la etapa ii) de la presencia de cualquiera de las mutaciones R451C y/o K467T con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o la correlación de la ausencia de todos estos aminoácidos de la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.

En una realización más en particular del método, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la etapa i) engloba la determinación de si la SEQ ID NO: 4 está adicionalmente presente en la muestra del sujeto. Por lo tanto, después de determinar si está presente cualquiera de las mutaciones R451C y/o S464L y/o G465R y/o K467T, el método incluye también la determinación de si está presente la mutación S492R en la proteína EGFR.

La detección de la mutación S492R se refiere a la realización en particular del método *in vitro*, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, en las que la etapa i) comprende adicionalmente la determinación de la presencia o la ausencia de una arginina en la posición 492 de la secuencia de aminoácidos

correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y en la que en la etapa ii) la presencia adicional de la arginina identificada en la etapa i) se correlaciona con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab.

5 En otra realización en particular, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el método *in vitro* para la predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab, comprende adicionalmente la determinación en la etapa (i) de la presencia o la ausencia de una metionina en la posición 491 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y en la que en la etapa ii) la presencia adicional de la metionina identificada en la etapa i) se correlaciona con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab.

10 En otra realización en particular, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la etapa i) se lleva a cabo con un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID NO: 6 y 7.

15 Además de la amplificación con los anteriormente mencionados cebadores, en una realización en particular, la etapa i) se lleva a cabo mediante métodos de genotipado. En otra realización más en particular, opcionalmente junto con cualquier realización anterior o posterior, dicho método de genotipado se selecciona entre secuenciación de Sanger, pirosecuenciación, PCR digital de gotita (ddPCR), PCR específica de alelos, cromatografía líquida desnaturante a alta presión (DHPLC), extensión de cebadores específicos de alelos (ASPE), biochips/micromatrices de ADN e hibridación dinámica específica de alelo (DASH). En otra realización más en particular, el método de genotipado es
20 la pirosecuenciación.

Algunos ejemplos de métodos de genotipado por pirosecuenciación incluyen, entre otros, los métodos de secuenciación de siguiente generación (NGS) conocidos como pirosecuenciación 454 de alto rendimiento, la secuenciación mediante síntesis (Illumina) y la secuenciación de terminación de la cadena (secuenciación de
25 Sanger).

Alternativamente, la etapa i) incluye sondas específicas para la detección de mutaciones naturales o puntuales como método de genotipado de las regiones amplificadas. Algunas sondas en particular son aquellos oligonucleótidos que codifican la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10. Todos estos
30 oligonucleótidos son complementarios de las secuencias de nucleótidos de los genes *EGFR* mutados.

El método *in vitro* para la predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab, se lleva a cabo en una muestra que comprende el tumor, en la que pueden detectarse los cambios de nucleótidos en el gen *EGFR* de la presente invención. En los casos de CCRm, la muestra puede
35 usarse directamente según se obtiene de la fuente, o después de un pretratamiento de la muestra. La muestra puede comprender adicionalmente tejido normal adyacente a dicho tumor. Consecuentemente, en el caso de un CCRm, la muestra se selecciona entre una biopsia de un cáncer colorrectal primario o una biopsia de una metástasis del mismo. En otras palabras, la muestra puede ser una biopsia de unas muestras de cáncer colorrectal, incluyendo tumores primarios y metástasis. En una realización preferida, la metástasis está en el tejido hepático.

40 Es probable que los pacientes que comprendan cualquiera de las recién identificadas mutaciones muestren una respuesta a un régimen terapéutico que no comprende cetuximab, según se mide mediante cualquier aumento o prolongación clínica o subclínica adecuada en la supervivencia sin progresión.

45 En una realización preferida, el régimen terapéutico es cetuximab solo o junto con un régimen quimioterapéutico basado en irinotecán, oxaliplatino y/o 5-fluorouracilo (5-FU o 5FU). En una realización preferida, el régimen terapéutico es panitumumab solo o junto con un régimen quimioterapéutico basado en irinotecán, oxaliplatino y/o 5-fluorouracilo.

50 La invención proporciona adicionalmente también métodos para decidir y/o recomendar un régimen terapéutico para sujetos afectados por cáncer, preferentemente por CCRm, que comprenden: i) la determinación mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas, de la presencia o la ausencia de al menos uno de los siguientes aminoácidos:

55 una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, en una muestra tomada del sujeto; y ii) recomendar la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz de cetuximab, o de una composición del mismo, si todas las mutaciones están ausentes, o de panitumumab, o de una composición del mismo, si hay presente al menos una de las mutaciones.

60 La invención engloba también un método *in vitro* para la determinación de la resistencia adquirida a un régimen terapéutico que comprende cetuximab, método que comprende, en una realización en particular de este aspecto:

65 i) la determinación mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas, de la presencia o la ausencia de al menos uno de los siguientes aminoácidos:

una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, en una muestra tomada del sujeto; y

- 5 ii) la correlación de la presencia de cualquiera de los aminoácidos identificados en la etapa i) con la resistencia adquirida del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o la correlación de la ausencia de todos estos aminoácidos en la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.

- 10 Como se ha expuesto anteriormente, la invención proporciona también un método *in vitro* de identificación, en una muestra tomada de un sujeto, de la presencia o la ausencia de una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas. En una realización preferida, el método *in vitro* de identificación de la presencia o la ausencia de una o ambas mutaciones en la SEQ ID NO: 2 comprende adicionalmente la identificación de la presencia o la ausencia de una arginina en la posición 492 de la SEQ ID NO: 2 mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas.

- 20 En una realización en particular, opcionalmente junto con cualquier realización anterior o posterior, el método de identificación de la presencia o la ausencia de una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una leucina en la posición 464 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una arginina en la posición 465 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o de la presencia o la ausencia de una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, se lleva a cabo mediante la determinación de la secuencia de la SEQ ID NO: 2 hasta la posición 467 mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas. En una realización preferida, el método se lleva a cabo mediante la determinación de la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición 450 hasta la 470 (SEQ ID NO: 12) y más preferentemente desde la 451 hasta la posición 467. Por "la determinación de una secuencia hasta una posición" debe entenderse que la secuenciación se lleva a cabo desde un oligonucleótido o aminoácido desde la posición 1 de dicha secuencia hasta la posición (nucleótido o aminoácido) de interés (en este caso en particular, hasta el aminoácido 467 o hasta el nucleótido que da lugar a este aminoácido).

- 30 A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y las variaciones de la palabra no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Adicionalmente, la palabra "comprende" engloba el caso de "que consiste en". Otros objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el análisis de la descripción, o pueden ser aprendidos mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de las realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1. Muestras de tumores y pacientes

- 45 Se llevó a cabo una metodología de prueba preliminar para estudiar y caracterizar la presencia de las mutaciones heterogéneas que aparecen después de una terapia basada en cetuximab en la práctica clínica habitual. Todos los pacientes con CCRm que consintieron, tratados con AcMc anti-EGFR en la institución Parc de Salut Mar Biobank (MARBiobanc, Barcelona, España) Hospital del Mar entre enero de 2010 y junio de 2013, fueron incluidos en este estudio. En 34 pacientes, las muestras fueron recogidas prospectivamente para este estudio, y en 3 pacientes se analizaron biopsias secuenciales tomadas en el pasado en el contexto de su gestión clínica rutinaria. En el análisis sólo se incluyeron los pacientes que tenían una buena calidad en las biopsias previas y posteriores al tratamiento y que habían tenido una resistencia adquirida a la terapia basada en anti-EGFR, definida como la progresión de la enfermedad después de a) una respuesta completa o una respuesta parcial o b) una enfermedad estable durante más de 16 semanas (7-9). La respuesta fue evaluada según los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST) (Eisenhauer et al., "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (versión 1.1)", Eur J Cancer 2009, Vol. 45 (2): 228-247). Se usó la biopsia tumoral obtenida durante el procedimiento habitual de diagnóstico como la muestra previa al tratamiento (inicial). En la mayoría de los casos, esta muestra se obtuvo a partir del tumor primario durante una colonoscopia rutinaria. Una segunda biopsia inicial de un sitio metastásico no es de rutina, y no se realizó salvo que fuera necesaria para el diagnóstico patológico. El estudio incluía una nueva biopsia después del fracaso del tratamiento en los pacientes que consintieron este procedimiento adicional. Las nuevas biopsias en el momento de la progresión se obtuvieron a partir de la lesión más accesible con menos riesgo potencial de complicaciones relacionadas para el paciente, según las consideraciones éticas. Se recogieron muestras de suero antes de comenzar la terapia basada en cetuximab y en el momento de la progresión.
- 65 Cuando se detectó una mutación en la muestra de biopsia posterior al tratamiento, la muestra de suero de ese

paciente fue analizada para evaluar esa mutación específica. En este estudio se incluyeron nueve casos (los pacientes #21 hasta #28 y el paciente #36) que habían sido evaluados previamente para las mutaciones *EGFR* S492R, exón 2 del *KRAS*, *BRAF* V600E y *PIK3CA* mediante una secuenciación directa y que en el trabajo actual fueron analizados para evaluar las mutaciones indicadas anteriormente (R451C y K467T) usando una secuenciación profunda. Las muestras biológicas se obtuvieron en el Parc de Salut Mar Biobank (MARBiobanc). Este estudio fue aprobado por el comité de ética local (CEIC-2012/4741/I). Todos los pacientes participantes firmaron el consentimiento informado por escrito.

Para la secuenciación de *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* y *EGFR*, se llevó a cabo una extracción del ADN a partir de muestras tumorales como se ha descrito anteriormente en Diaz et al. "The molecular evolution of acquired resistance to targeted *EGFR* blockade in colorectal cancers", *Nature*-2012, Vol nº 486, págs.: 537-40. El análisis de las mutaciones del *KRAS* (exones 2, 3 y 4), del *BRAF* (exón 15), del *NRAS* (exones 2 y 3), del *PIK3CA* (exones 9 y 20) y del *EGFR* (exón 12, 13) se llevó a cabo mediante una secuenciación de Sanger usando BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se analizó con un analizador genético 3500Dx (Applied Biosystems). Todos los casos fueron cribados también mediante una pirosecuenciación usando una plataforma de secuenciación de siguiente generación (NGS) 454 GS Junior (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Además, las lecturas procesadas y con filtro de calidad fueron analizadas mediante el uso del soporte lógico GS Amplicon Variant Analyzer versión 2.5p1 (Roche). Las mutaciones detectadas con la NGS fueron confirmadas mediante una PCR competitiva específica de alelos TaqMan® (CAST-PCR, Applied Biosystems) cuando estaban disponibles los ensayos específicos.

Los cebadores para las secuencias del *EGFR* eran los divulgados anteriormente y estaban definidos por el conjunto de cebadores consistente en las SEQ ID NO: 6 y 7. El par de la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7 sirvió para la amplificación de la totalidad del exón 12 que podría contener las mutaciones R451C y K467T y algunas regiones flanqueantes del intrón. Esta secuencia está representada por la SEQ ID NO: 11:

```

caaagtttccagggatacattgttttatatatttcaccacatgattttctctccaatgtagTGGTCAGTTT
TCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCT
CAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGT
GCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAG
AAAACCAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAGtaagtcaccgctt
ctgttagttatggagttggttctaattgggtcctttattgtatttagaataattgaagggtattccattaa;

```

en la que los nucleótidos subrayados se corresponden con las secuencias idénticas (para la SEQ ID NO: 6) o complementarias (para la SEQ ID NO: 7) de los cebadores del conjunto, las letras mayúsculas se refieren al exón 12 y las minúsculas son fragmentos del intrón.

La amplificación se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos a 95 °C, 1 minuto, a 60 °C, 1' 30" y a 72 °C, 1 minuto; y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Además, se llevó a cabo una hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La FISH se llevó a cabo siempre que hubiera material restante suficiente después del análisis de las mutaciones. La amplificación del *EGFR* fue evaluada mediante una hibridación fluorescente *in situ* (FISH) usando la sonda LSI *EGFR/CEP7* (Abbott Molecular Inc., DesPlaines, IL), como se ha descrito previamente (por ejemplo, en documentos tales como Salido et al., "Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer", *J Thorac Oncol* - 2011, Vol. nº 6, págs.: 21-7). La amplificación del *KRAS* se analizó usando un ensayo de FISH de dos colores con una sonda *KRAS/CEP12* (Abnova). Se puntuaron las muestras con una proporción *KRAS/CEP12* mayor de 3, en al menos el 10 % de los 50 núcleos analizados. Cuando el número medio del cromosoma 12 excedía 2,5 o 4 por célula, el caso se consideraba polisómico o muy polisómico, respectivamente.

45 Ejemplo 2. Presencia de las mutaciones R451C y K467T en el *EGFR* y resistencia adquirida al cetuximab

Según se representa en la FIG 1, que es una gráfica de dos visualizaciones diferentes de una plataforma de secuenciación de la siguiente generación (NGS) 454 GS Junior (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), muestra que algunos pacientes adquirieron mutaciones en el ectodominio del *EGFR* después del tratamiento con cetuximab. La FIG. 1 (A) muestra un paciente #31, en el que la muestra de tumor posterior al tratamiento había adquirido una sustitución A -> C en el nucleótido 1400 del gen *EGFR* que no estaba presente en la biopsia previa al tratamiento, causando una sustitución de una lisina por una treonina en el aminoácido 467 (K467T). La sustitución es detectada mediante el método de genotipado y visualizada (flecha) mediante un medio de doble pico (banda o curva) en esta posición. El pico inferior se corresponde con el nucleótido C.

Por otro lado, en la FIG. 1 (B) se muestra la visualización del proceso de secuenciación (la lectura menos la referencia) del paciente #35, en el que se detectó una sustitución C -> T en el nucleótido 1351 del gen *EGFR* en la

muestra posterior al tratamiento, dando lugar a la sustitución de una arginina por una cisteína en el aminoácido 451 (R451C). La sustitución también está marcada por una flecha, y en este caso el cambio es visualizado por un valor negativo.

5 Ejemplo 3. Las mutaciones en la SEQ ID NO: 12 (fragmento desde el aminoácido 450 hasta el aminoácido 470 de la SEQ ID NO: 2) implican una resistencia al tratamiento con cetuximab.

3A: mutaciones en el ectodominio del EGFR y resistencia adquirida al cetuximab en modelos de células CCR

10 Previamente se había notificado que la adquisición de resistencia en células de CCR estaba asociada con la aparición de una mutación activante de KRAS, BRAF y NRAS. Para descubrir mecanismos de resistencia adicionales al bloqueo del EGFR se explotaron 5 líneas celulares de CCR (DiFi, LIM1215, HCA-46, NCIH508, OXCO-2 y CCK81), que son muy sensibles al cetuximab. Todas estas líneas celulares son naturales para KRAS, NRAS, BRAF y PIK3CA, con la excepción de NCIH508, que muestra la mutación p.E545K PIK3CA. En conjunto, todos estos modelos celulares recogen las características moleculares de los tumores de los pacientes con CCR que es probable que respondan a terapias anti EGFR. Para cada línea se expusieron al menos cinco millones de células de forma continua al cetuximab hasta que aparecieron poblaciones resistentes. Para definir los mecanismos moleculares subyacentes en la adquisición de la resistencia, inicialmente se llevó a cabo una secuenciación de Sanger de los genes implicados en la regulación de la ruta de señalización del EGFR (EGFR, KRAS, BRAF, NRAS y PIK3CA). Según los informes previos, las poblaciones resistentes a menudo muestran las mutaciones KRAS, BRAF y NRAS (véase Misale et al. "Blockade of egfr and mek intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-egfr therapies in colorectal cancer", *Sci Transl Med*-2014; 6: 224ra226). Todos estos alelos fueron detectados en las células resistentes, pero no en la correspondiente población parental a partir de la cual se habían originado. De forma importante, en numerosas ocasiones había presentes simultáneamente múltiples alteraciones genéticas en la población de células resistentes, lo que indicaba su estado policlonal. Para evaluar las características moleculares de los clones individuales se llevaron a cabo por lo tanto unas diluciones celulares limitadas de LIM1215 y de CCK81, ya que estas líneas celulares son susceptibles a este procedimiento. Después, los clones individuales fueron sometidos a una secuenciación de Sanger para buscar los genes candidatos (EGFR, KRAS, BRAF, NRAS y PIK3CA). De forma notable, el perfil de la mutación de los clones identificó tres nuevas variantes del EGFR: S464L, G465R y I491M. Las mutaciones S464L, G465R, junto con las mutaciones del Ejemplo 2 (R541C y K467T) están localizadas en la SEQ ID NO: 12 (un fragmento que define parte del epítipo de unión al cetuximab). Considerando que los derivados resistentes son policlonales, y a la luz de la limitada sensibilidad del método de secuenciación de Sanger, se postuló que las variantes presentes en menos del 20 % de las poblaciones celulares podrían haber quedado sin detectar. Para identificar las mutaciones presentes con una baja frecuencia, se empleó una PCR digital de gotita (ddPCR) que es conocida por tener una sensibilidad de mutante/natural de 1:20.000. Las sondas de la ddPCR fueron diseñadas y validadas individualmente usando un ADN mutante de control para detectar las variantes del EGFR identificadas previamente en las biopsias tumorales o en las líneas celulares. Este análisis desveló la presencia de 3 nuevas variantes del EGFR (S464L, G465R y I491M) que no habían sido detectadas mediante la secuenciación de Sanger en las poblaciones de células resistentes. La ddPCR no pudo llevarse a cabo en las muestras tisulares debido a que no había quedado suficiente material. Globalmente, el panorama de mutaciones de las líneas celulares con resistencia adquirida al cetuximab resume los perfiles moleculares de los tumores que reaparecieron tras el tratamiento con cetuximab.

45 ddPCR™ Supermix para sondas (Bio-Rad) usando un ensayo para *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *EGFR* (PrimePCR™ ddPCR™ Mutation Assay, Bio-Rad y de diseño personalizado). La ddPCR se llevó a cabo según el protocolo del fabricante, y los resultados se notificaron en forma de un porcentaje o de la abundancia fraccionaria de los alelos del ADN mutante con respecto a alelos del ADN total (mutante más natural). Se añadieron entre 8 y 10 µl de molde de ADN a 10 µl de ddPCR™ Supermix para sondas Probes (Bio-Rad) y 2 µl de la mezcla cebador/sonda. Esta muestra de 20 µl se añadió a 70 µl de aceite de generación de gotitas para sondas (Bio-Rad) y se usó para la generación de gotitas. Después, las gotitas se termociclaron en las siguientes condiciones: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 94 °C durante 30 s, a 55 °C durante 1 minuto seguido de 98 °C durante 10 minutos (velocidad de ascenso de 2 °C/s). Después, las muestras se transfirieron a un lector de gotitas QX200™ (Bio-Rad) para la medición fluorescente de las sondas FAM y HEX. La separación se llevó a cabo basándose en los controles positivos y negativos y se identificaron las poblaciones mutantes. Se calcularon las abundancias fraccionarias del ADN mutante en el trasfondo de ADN natural para cada muestra usando el soporte lógico QuantaSoft (Bio-Rad). Se llevaron a cabo múltiples réplicas (mínimo de cuatro) para cada muestra. Se llevaron a cabo análisis de ddPCR del ADN normal de control de las líneas celulares y de los controles sin molde de ADN (agua) en paralelo para todas las muestras, incluyendo de nuevo múltiples réplicas como control exento de contaminación. Las secuencias de las sondas y los cebadores de *EGFR* están disponibles bajo solicitud.

60 El cultivo celular y la generación de las células resistentes utilizadas en el presente documento ya han sido descritos previamente (véase Misale S et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012; 486: 532-6; Misale S, Arena S et al Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 224ra26). Las células CCK81 se cultivaron en medio MEM (Invitrogen) suplementario con un 5 % de FBS,

L-glutamina 2 mM, antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina) y se cultivaron en una estufa de incubación a 37 °C y aire con un 5 % de CO₂. Los derivados CCK81 resistentes al cetuximab se obtuvieron aumentando progresivamente la dosis de cetuximab desde 80 nM hasta 1,4 µM en el transcurso de seis meses.

5 3B: presencia de las mutaciones S464L, G465R y K467T en el EGFR y resistencia al cetuximab

Para establecer si las mutaciones del EGFR S464L, G465R y K467T de la invención eran responsables de la resistencia observada al cetuximab, el EGFR natural completo y cualquiera de las mutaciones S464L, G465R o K467T del EGFR fueron expresados ectópicamente en la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón cultivados NIH3T3 que carecen de una expresión endógena detectable del EGFR.

El EGFR fue estimulado con su ligando natural EGF en presencia de cetuximab o de panitumumab en células transfectadas. La unión del anticuerpo se analizó mediante una citometría de flujo usando un anticuerpo secundario contra la IgG humana conjugada con ficoeritrina (PE). Se usaron células NIH 3T3 que expresan el vector vacío como control negativo (VACÍO). El porcentaje de células que se unen al anticuerpo se muestra en los diagramas de puntos bidimensionales de las FIG 2-4. En esta FIG. 2-4, los recuentos celulares (C de "recuentos", eje Y) del canal FL2H de detección de la fluorescencia están representados para el ensayo con cetuximab (FIG. 2A, 3A y 4A) y para el ensayo con panitumumab (FIG. 2B, 3B y 4B).

En las células naturales para el EGFR (EGFR natural en las FIG. 2-4 A/B), tanto el cetuximab como el panitumumab inhibieron la activación del EGFR, mientras que en las células portadoras de la mutación K467T (EGFR_K467T en la FIG. 2 A/B), S464L (EGFR_S464L en la FIG. 3 A/B) y G465R (EGFR_G465R en la FIG. 4 A/B), el panitumumab, pero no el cetuximab, efectivamente bloqueó la activación del EGFR inducida por el EGF. VACÍO es el control negativo (células que no expresan el EGFR)

Para las construcciones de ADN, la construcción pLX301-EGFR natural, una generosa donación del Dr. C. Sun y del Prof R. Bernards (NKI, Ámsterdam), se construyó a partir de pLX301 (Addgene®). Los mutantes del *EGFR* que contenían las 4 mutaciones puntuales (R451C, S464L, G465R y K467T) se construyeron usando los kits de mutagénesis dirigida QuikChange® II de Agilent Technologies con el plásmido pLX301-EGFR natural como ADN de molde. La presencia de las mutaciones se confirmó mediante una secuenciación del ADN.

30

Referencias citadas en la solicitud

- Mendelsohn J, Baselga J et al., "Epidermal growth factor receptor targeting in cancer". *Semin Oncol* - 2006, Vol. 33, págs.: 369-38.
- 35 - Lynch TJ et al., "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib", *N Engl J Med*-2004, Vol. 350, págs.: 2129-2139.
- Misale et al., "Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer", *Nature* - 2012, Vol. nº 486, págs.: 532-536.
- Montagut et al., "Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer", *Nature medicine* - 2012, Vol. nº 18, págs.: 221-223.
- 40 - Voigt et al., "Functional Dissection of the Epidermal Growth Factor Receptor Epitopes Targeted by Panitumumab and Cetuximab", *Neoplasia* - 2012, Vol. nº 14 (11), págs.: 1023-1031.
- Karapetis et al., "K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer", *The New England Journal of Medicine* - 2008, Vol. 359, págs.: 1757-1765.
- 45 - Eisenhauer et al., "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)", *Eur J Cancer* 2009, Vol. 45 (2): 228-247.
- Salido et al., "Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer", *J Thorac Oncol* - 2011, Vol. nº 6, págs.: 21-7.
- Diaz et al. "The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers", *Nature*- 2012, Vol. nº 486, págs.: 537-40.
- 50 - Misale et al. "Blockade of egfr and mek intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-egfr therapies in colorectal cancer", *Sci Transl Med*- 2014; 6: 224ra226.

LISTADO DE SECUENCIAS

55

<110> Fundació Institut Mar d'Investigacions Mèdiques (FIMIM) ALBERTO BARDELLI SABRINA

<120> Mutaciones en el dominio extracelular III del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico

60 <130> P2949PC00

<150> EP14382288

<151> 28-07-2014

65 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 17

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (1)..(1)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre arginina (R) y cisteína (C)

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (17)..(17)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre lisina (K) y treonina (T)

<400> 1

Xaa Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn
1 5 10 15

20 **Xaa**

<210> 2

<211> 1210

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<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

ES 2 693 080 T3

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

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

ES 2 693 080 T3

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 Asn 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

ES 2 693 080 T3

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
 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 Thr 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	
	1010		1015			1020		
Phe	Ser Ser	Pro Ser	Thr Ser	Arg Thr	Pro Leu	Leu Ser	Ser Ser	Leu
	1025		1030			1035		
Ser	Ala Thr	Ser Asn	Asn Ser	Thr Val	Ala Cys	Ile Asp	Arg Asn	
	1040		1045			1050		

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

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

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

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

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

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
 1130 1135 1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
 1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
 1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
 1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
 1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
 1205 1210

<210> 3
 <211> 5616
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

ES 2 693 080 T3

ccccggcgca	gcgcggccgc	agcagcctcc	gccccccgca	cggtgtgagc	gcccgacgcg	60
gccgaggcgg	ccggagtccc	gagctagccc	cggcggccgc	cgccgccag	accggacgac	120
aggccacctc	gtcggcgtcc	gcccgagtcc	ccgcctcgcc	gccaacgcca	caaccaccgc	180
gcacggcccc	ctgactccgt	ccagtattga	tcgggagagc	cggagcgcgc	tottcgggga	240
gcagcgatgc	gacctccgg	gacggccggg	gcagcgctcc	tggcgtgct	ggctgcgctc	300
tgccccggca	gtcgggctct	ggaggaaaag	aaagtttgcc	aaggcacgag	taacaagctc	360
acgcagttgg	gcacttttga	agatcatttt	ctcagcctcc	agaggatggt	caataactgt	420

ES 2 693 080 T3

gaggtggtcc ttgggaattt ggaaattacc tatgtgcaga ggaattatga tctttccttc 480
ttaaagacca tccaggaggt ggctggttat gtctcattg ccctcaacac agtggagcga 540
attcctttgg aaaacctgca gatcatcaga ggaatatgt actacgaaa ttcctatgcc 600
ttagcagtct tatctaacta tgatgcaaat aaaaccggac tgaaggagct gcccatgaga 660
aatttacagg aaatcctgca tggcgccgtg cggttcagca acaaccctgc cctgtgcaac 720
gtggagagca tccagtggtg ggacatagtc agcagtgact ttctcagcaa catgtogatg 780
gacttccaga accacctggg cagctgccaa aagtgtgatc caagctgtcc caatgggagc 840
tgctggggtg caggagagga gaactgccag aaactgacca aaatcatctg tgcccagcag 900
tgctccgggc gctgccgtgg caagtcccc agtgactgct gccacaacca gtgtgtgca 960
ggctgcacag gccccggga gagcgactgc ctggtctgcc gcaaattccg agacgaagcc 1020
acgtgcaagg acacctgcc cccactcatg ctctacaacc ccaccagta ccagatggat 1080
gtgaaccccg agggcaata cagctttggt gccacctgct tgaagaagtg tccccgtaat 1140
tatgtggtga cagatcacgg ctctgctgct cgagcctgtg gggccgacag ctatgagatg 1200
gaggaagacg gogtccgcaa gtgtaagaag tgcgaagggc cttgccgcaa agtgtgtaac 1260
ggaataggta ttggtgaatt taaagactca ctctccataa atgctacgaa tattaaacac 1320
ttcaaaaact gcacctccat cagtggcgat ctccacatcc tgccggtggc atttaggggt 1380
gactccttca cacatactcc tctctggat ccacaggaac tggatattct gaaaaccgta 1440
aaggaaatca cagggttttt gctgattcag gcttggcctg aaaacaggac ggacctccat 1500
gcctttgaga acctagaaat catacggggc aggaccaagc aacatggtca gttttctctt 1560
gcagtgtca goctgaacat aacatccttg ggattacgct ccoctcaagga gataagtgat 1620
ggagatgtga taatttcagg aaacaaaaat ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa 1680
aaactgtttg ggacctccgg tcagaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaaacagc 1740
tgcaaggcca caggccaggt ctgccatgcc ttgtgctccc ccgagggctg ctggggcccg 1800
gagcccaggg actgctctc ttgccggaat gtcagccgag gcagggaatg cgtggacaag 1860
tgcaaccttc tggaggggtg gccaaaggag tttgtggaga actctgagtg catacagtgc 1920
caccagagt gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca caggacgggg accagacaac 1980
tgtatccagt gtgccacta cattgacggc cccactgctg tcaagacctg cccggcagga 2040
gtcatgggag aaaacaacac cctggtctgg aagtacgag acgccggcca tgtgtgccac 2100
ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actgggccag gtcttgaagg ctgtccaacg 2160
aatgggcta agatcccgtc catcgccact gggatggtgg gggccctcct cttgtgtgtg 2220
gtggtggccc tggggatcgg cctcttcatg cgaaggcgcc acatcgttcg gaagcgcacg 2280

ES 2 693 080 T3

ctgCGGaggc tgctgcagga gagggagcct gtggagcctc ttacaccag tggagaagct 2340
cccaaccaag ctctcttgag gatcttgaag gaaactgaat tcaaaaagat caaagtgtg 2400
ggctccggtg cgttcggcac ggtgtataag ggactctgga tcccagaagg tgagaaagtt 2460
aaaattcccg tcgctatcaa ggaattaaga gaagcaacat ctccgaaagc caacaaggaa 2520
atcctcgatg aagcctacgt gatggccagc gtggacaacc cccacgtgtg ccgctgtgtg 2580
ggcatctgcc tcacctccac cgtgcagctc atcacgcagc tcatgccctt cggetgcctc 2640
ctggactatg tccgggaaca caaagacaat attggctccc agtacctgct caactgggtg 2700
gtgcagatg caaagggcac gaactacttg gaggaccgtc gcttggtgca ccgcgacctg 2760
gcagccagga acgtactggt gaaaacaccg cagcatgtca agatcacaga ttttgggctg 2820
gccaaactgc tgggtgcgga agagaaagaa taccatgcag aaggaggcaa agtgctatc 2880
aagtggatgg cattggaatc aattttacac agaactata cccaccagag tgatgtctgg 2940
agctacgggg tgaccgtttg ggagttgatg acctttggat ccaagccata tgacggaatc 3000
cctgccagcg agatctctc catcctggag aaaggagaac gcctccctca gccaccata 3060
tgtaccatcg atgtctacat gatcatggtc aagtgtgga tgatagacgc agatagtgc 3120
ccaaagtcc gtgagttgat catcgaatc tccaaaatg cccgagacc ccagcgtac 3180
cttgtcattc aggggatga aagaatgcat ttgccaagtc ctacagactc caactctac 3240
cgtgccctga tggatgaaga agacatggac gacgtggtg atgccgacga gtacctatc 3300
ccacagcagg gcttcttcag cagcccctcc acgtcacgga ctcccctct gagctctctg 3360
agtgcaacca gcaacaatc caccgaggct tgcattgata gaaatgggct gcaaagctgt 3420
cccatcaagg aagacagctt cttgcagcga tacagctcag accccacagg cgccttgact 3480
gaggacagca tagacgacac ctctctccca gtgcctgaat acataaacca gtcogtccc 3540
aaaaggcccg ctggctctgt gcagaatcct gtctatcaca atcagcctct gaaccccgcg 3600
cccagcagag acccacacta ccaggacccc cacagcactg cagtgggcaa ccccgagtat 3660
ctcaacactg tccagcccac ctgtgtcaac agcacattcg acagccctgc ccactgggce 3720
cagaaaggca gccaccaaat tagcctggac aacctgact accagcagga cttcttccc 3780
aaggaagcca agccaaatg catctttaag ggctccacag ctgaaaatgc agaataccta 3840
aggtgcgcg cacaaagcag tgaatttatt ggagcatgac cacggaggat agtatgagcc 3900
ctaaaaatcc agactcttc gataccagc accaagccac agcaggtcct ccatcccaac 3960
agccatgccc gcattagctc ttagaccac agaotggtt tgcaacgtt acaccgacta 4020
gccaggaagt acttccacct cgggcacatt ttgggaagt gcattcctt gtcttcaaac 4080
tgtgaagcat ttacagaaac gcattccagca agaattattg cccttgagc agaaatttat 4140
cttcaaga ggtatattg aaaaaaaaaa aaagtatatg tgaggattt tattgattg 4200

ES 2 693 080 T3

ggatcttgga gtttttcatt gtcgctattg atttttactt caatgggctc ttccaacaag 4260
 gaagaagctt gctggtagca cttgctaccc tgagttcatc caggcccaac tgtgagcaag 4320
 gagcacaagc cacaagtctt ccagaggatg cttgattcca gtggttctgc ttcaaggctt 4380
 ccactgcaaa acaactaaaga tccaagaagc ccttcatggc ccagcaggc cggatcggta 4440
 ctgtatcaag tcatggcagg tacagtagga taagccactc tgtcccttcc tgggcaaaga 4500
 agaaacggag gggatggaat tcttcttag acttactttt gtaaaaatgt ccccacggta 4560
 cttactcccc actgatggac cagtggtttc cagtcatgag cgttagactg acttgtttgt 4620
 cttccattcc attgttttga aactcagtat gctgcccctg tcttgctgtc atgaaatcag 4680
 caagagagga tgacacatca aataataact cggattccag cccacattgg attcatcagc 4740
 atttggacca atagcccaca gctgagaatg tggaatacct aaggatagca ccgcttttgt 4800
 tctcgcaaaa acgtatctcc taatttgagg ctcagatgaa atgcatcagg tcctttgggg 4860
 catagatcag aagactacaa aatgaagct gctctgaaat ctcttttagc catcaccoca 4920
 acccccaaaa attagtttgt gttacttatg gaagatagtt ttctcctttt acttcacttc 4980
 aaaagctttt tactcaaaga gtatatgttc cctccaggtc agctgcccc aaacccctc 5040
 cttacgcttt gtcacacaaa aagtgtctct gccttgagtc atctattcaa gcacttacag 5100
 ctctggccac aacagggcat tttacagtg cgaatgacag tagcattatg agtagtggtg 5160
 aattcaggta gtaaatatga aactagggtt tgaaattgat aatgctttca caacatttgc 5220
 agatgtttta gaaggaaaaa agttccttcc taaaataatt tctctacaat tggaagattg 5280
 gaagattcag ctagttagga gccaccttt tttcctaac tgtgtgtgcc ctgtaacctg 5340
 actggttaac agcagtcctt tgtaaacagt gttttaaact ctctagtca atatccacc 5400
 catccaattt atcaaggaag aatggttca gaaaatattt tcagcctaca gttatgttca 5460
 gtcacacaca catacaaat gttccttttg cttttaaagt aatttttgac tccagatca 5520
 gtcagagccc ctacagcatt gttaagaaag tatttgattt ttgtotcaat gaaaataaaa 5580
 ctatattcat ttccactcta aaaaaaaaaa aaaaaa 5616

<210> 4

<211> 25

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (25)..(25)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre serina (S) y arginina (R)

<400> 4

Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Lys Thr Lys Ile Ile Xaa
 20 25

<210> 5

<211> 42

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (1)..(1)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre arginina (R) y cisteína (C)

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (17)..(17)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre lisina (K) y treonina (T)

<220>

<221> VARIANTE

20 <222> (42)..(42)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre arginina (R) y lisina (K)

<400> 5

Xaa Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn
 1 5 10 15

Xaa Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly
 20 25 30

Thr Ser Gly Gly Lys Thr Lys Ile Ile Xaa
 35 40

25

<210> 6

<211> 27

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador directo

35 <400> 6

caaagtttc agggatacat tgtttt 27

<210> 7

<211> 26

40 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso

45

<400> 7

ttaaattggga atagcccttc aatatt 26

<210> 8

ES 2 693 080 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 8

Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn
 1 5 10 15

Thr

<210> 9
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9
 15

Cys Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn
 1 5 10 15

Thr

<210> 10
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Cys Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn
 1 5 10 15

Lys

25
 <210> 11
 <211> 355
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

caaagttttc agggatacat tgtttttata ttttcaaccac atgatttttc ttctotocaa 60
tgtagtggtc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 120
tcctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 180
gcaaatacaa taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata 240
agcaacagag gtgaaaacag ctgcagtaag tcaccgcttt ctgtttagtt tatggagttg 300
gttctaattgg gtcctttatt tgtatttaga atattgaagg gctattccca tttaa 355

35

<210> 12
 <211> 21
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly
1 5 10 15

Asn Lys Asn Leu Cys
20

5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

15 <223> X es un aminoácido seleccionado entre arginina (R) y cisteína (C)

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

20 <223> X es un aminoácido seleccionado entre serina (S) y leucina (L)

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)..(15)

25 <223> X es un aminoácido seleccionado entre glicina (G) y arginina (R)

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

30 <223> X es un aminoácido seleccionado entre lisina (K) y treonina (T)

<400> 13

Xaa Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Xaa Xaa Asn
1 5 10 15

Xaa

35

<210> 14

<211> 42

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre arginina (R) y cisteína (C)

45

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre serina (S) y leucina (L)

50

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)..(15)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre glicina (G) y arginina (R)

ES 2 693 080 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre lisina (K) y treonina (T)

5

<220>

<221> VARIANTE

<222> (42)..(42)

<223> X es un aminoácido seleccionado entre serina (S) y arginina (R)

10

<400> 14

Xaa Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Xaa Xaa Asn
1 5 10 15

Xaa Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly
20 25 30

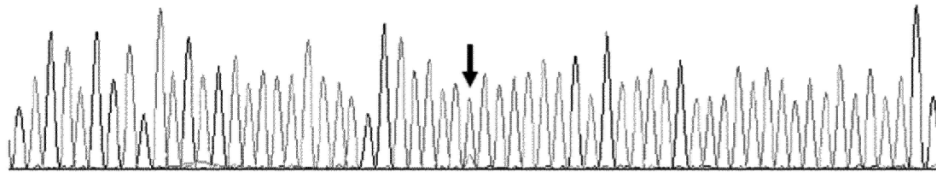
Thr Ser Gly Gly Lys Thr Lys Ile Ile Xaa
35 40

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia peptídica con una longitud de entre 17 y 100 aminoácidos y que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13
- 5 X^1 SLKEISDGDVIIX⁴X⁵NX², en la que
 X^1 se selecciona entre R y C;
 X^4 se selecciona entre S y L;
 X^5 se selecciona entre G y R;
 X^2 se selecciona entre K y T; y en la que al menos uno de X^1 , X^4 , X^5 y X^2 es, respectivamente, C, L, R o T.
- 10 2. La secuencia peptídica según la reivindicación 1, con una longitud de entre 17 y 100 aminoácidos y que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1
- 15 X^1 SLKEISDGDVIISGNX², en la que:
 X^1 se selecciona entre R y C;
 X^2 se selecciona entre K y T; y
en la que si X^1 es C, entonces X^2 se selecciona independientemente entre K y T, y si X^1 es R, entonces X^2 es T.
- 20 3. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 -2, comprendiendo adicionalmente dicho péptido la SEQ ID NO: 4
- NLCYANTINWKKLFGTSGGKTKIIX³, en la que
 X^3 se selecciona entre S y R.
- 25 4. La secuencia peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5
- X^1 SLKEISDGDVIISGNX²NLCYANTINWKKLFGTSGGKTKIIX³, en la que
 X^1 , X^2 y X^3 tienen el mismo significado que en las reivindicaciones 1, 2 y 3 y
en la que si X^1 es C, entonces X^2 se selecciona independientemente entre K y T, y si X^1 es R, entonces X^2 es T, o
que comprende la secuencia SEQ ID NO: 14
- 30 X^1 SLKEISDGDVIIX⁴X⁵NX²NLCYANTINWKKLFGTSGGKTKIIX³, en la que
 X^1 , X^2 y X^3 , X^4 y X^5 tienen el mismo significado que en las reivindicaciones 1, 2 y 3; y en la que al menos uno de X^1 ,
 X^4 , X^5 y X^2 es, respectivamente, C, L, R o T.
5. Un oligonucleótido que comprende una secuencia que codifica la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 13.
- 35 6. El oligonucleótido según la reivindicación 5, que codifica adicionalmente la SEQ ID NO: 4.
7. El oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, que comprende una secuencia que codifica la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 14.
- 40 8. Un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID Nos: 6 (CAAAGTTTTTCAGGGATACATTGTTTTT) y 7 (TTAAATGGGAATAGCCCTTCAATATT).
9. Un kit que comprende un conjunto de cebadores según se define en la reivindicación 8 y/o un oligonucleótido según se define en cualquiera de las reivindicaciones 5-7.
- 45 10. El kit según la reivindicación 9, que comprende adicionalmente reactivos para la detección de mutaciones en los genes KRAS y/o PIK3CA y/o BRAF y/o de mutaciones adicionales en el gen EGFR.
- 50 11. El kit según se define en cualquiera de las reivindicaciones 9-10, para su uso en la predicción de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende anticuerpos monoclonales anti-EGFR, preferentemente cetuximab y/o panitumumab.
12. Un método para la predicción *in vitro* de la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico que comprende cetuximab y/o panitumumab, en el que el método comprende
- 55 (i) la determinación en una muestra tomada del sujeto y mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas, de si hay presentes o ausentes mutaciones en un fragmento definido por la SEQ ID NO: 12, que es un fragmento desde el aminoácido 450 hasta el aminoácido 470 de la secuencia de aminoácidos natural consenso del EGFR humano de la SEQ ID NO: 2; y
- 60 (ii) la correlación de la presencia de cualquier mutación identificada en la etapa i) con la resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab, o
- la correlación de la ausencia de las mutaciones en la etapa i) con la respuesta del sujeto al régimen terapéutico que comprende panitumumab.
- 65

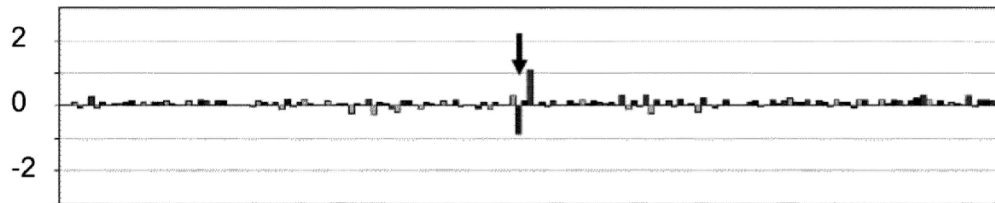
13. El método *in vitro* según la reivindicación 12, en el que en la etapa (i) se determina si en la SEQ ID NO: 12 está presente o ausente al menos una de las siguientes mutaciones: un cambio de una arginina por una cisteína en la correspondiente posición 451 de la SEQ ID NO: 2; de una serina por una leucina en la correspondiente posición 464 de la SEQ ID NO: 2; de una glicina por una arginina en la correspondiente posición 465 de la SEQ ID NO: 2; y de una lisina por una treonina en la correspondiente posición 467 de la SEQ ID NO: 2.
14. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que la etapa i) comprende adicionalmente la determinación de la presencia o la ausencia de una arginina en la posición 492 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y en la que en la etapa ii) la presencia adicional de la arginina identificada en la etapa i) se correlaciona con una resistencia del sujeto al régimen terapéutico que comprende cetuximab.
15. Un método *in vitro* de identificación, en una muestra tomada de un sujeto, de la presencia o la ausencia de una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2;
- 15 y/o de la presencia o la ausencia de una leucina en la posición 464 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2;
- 20 y/o de la presencia o la ausencia de una arginina en la posición 465 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2;
- 20 y/o de la presencia o la ausencia de una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2, comprendiendo el método la determinación de la secuencia de la SEQ ID NO: 2, al menos desde la posición 450 hasta la posición 470.
- 25 16. Un método *in vitro* de identificación, en una muestra tomada de un sujeto, de la presencia o la ausencia de una cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o la presencia o la ausencia de una leucina en la posición 464 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o
- 30 la presencia o la ausencia de una arginina en la posición 465 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2; y/o la presencia o la ausencia de una treonina en la posición 467 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2,
- 35 comprendiendo el método la determinación de los aminoácidos en las posiciones 451 y/o 464 y/o 465 y/o 467 mediante un medio seleccionado entre el grupo que consiste en métodos de genotipado y/o métodos de secuenciación de proteínas.

(A)



A>C
AAA>ACA
Lys>Thr
K467T

(B)



C>T
CGC>TGC
Arg>Cys
R451C

FIG. 1

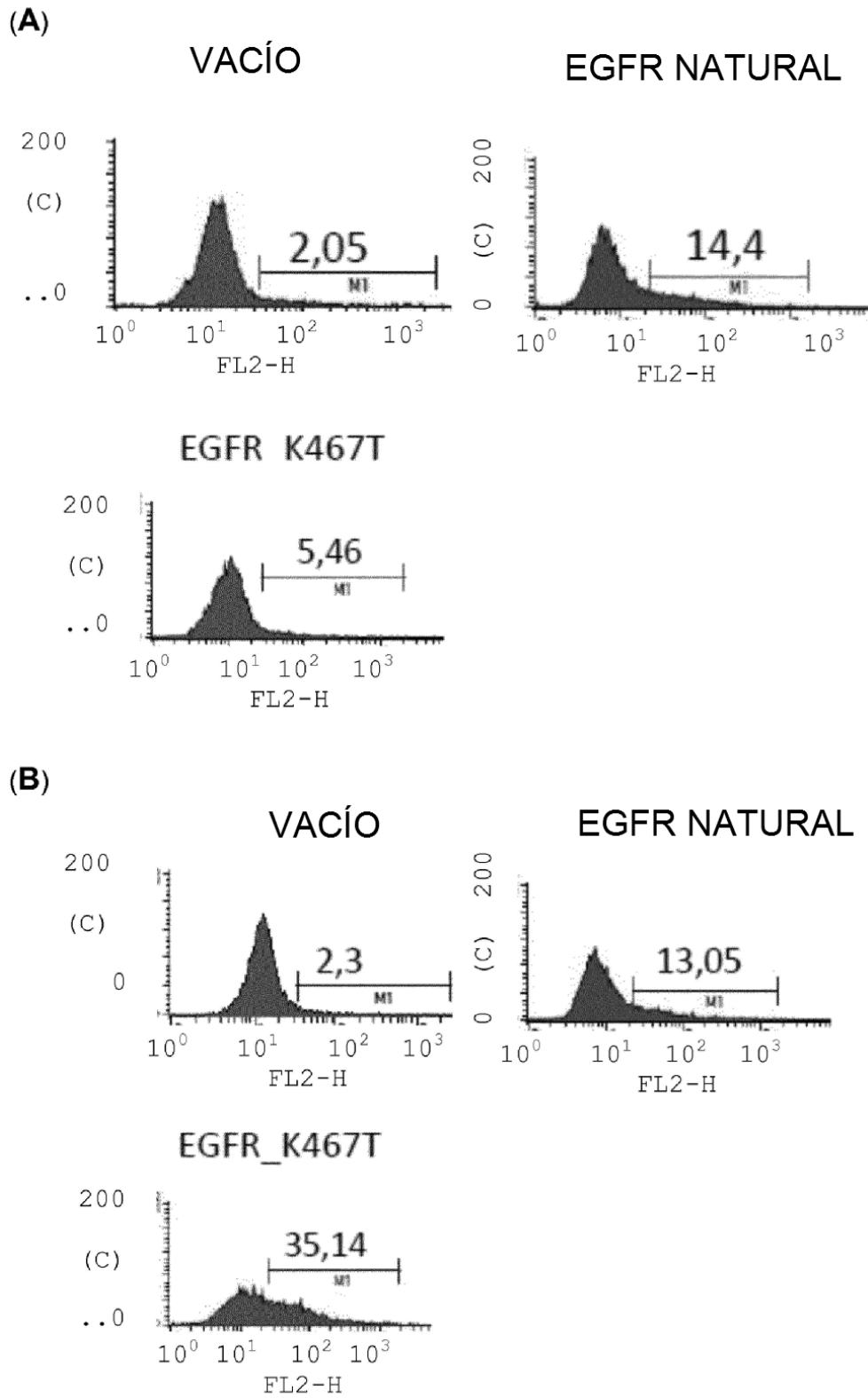
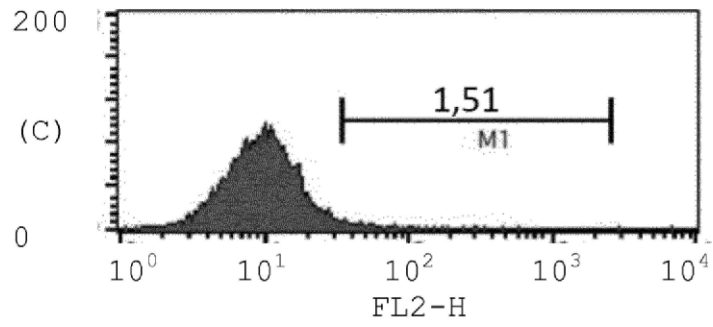


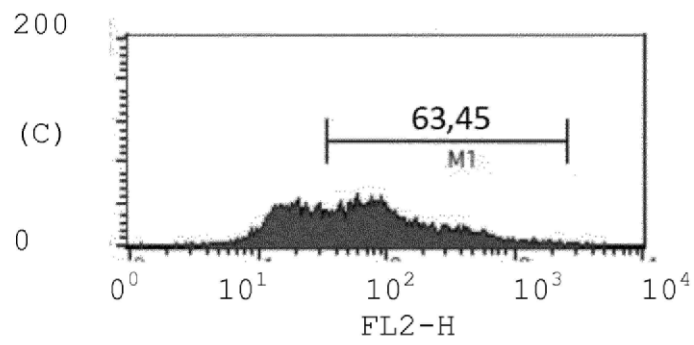
FIG. 2

(A)

Vacío



EGFR NATURAL



EGFR_S464L

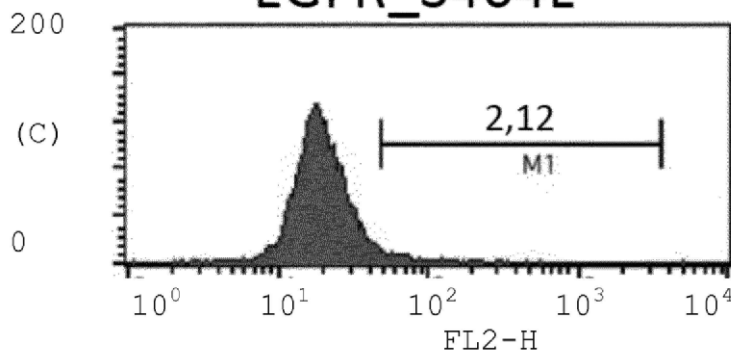
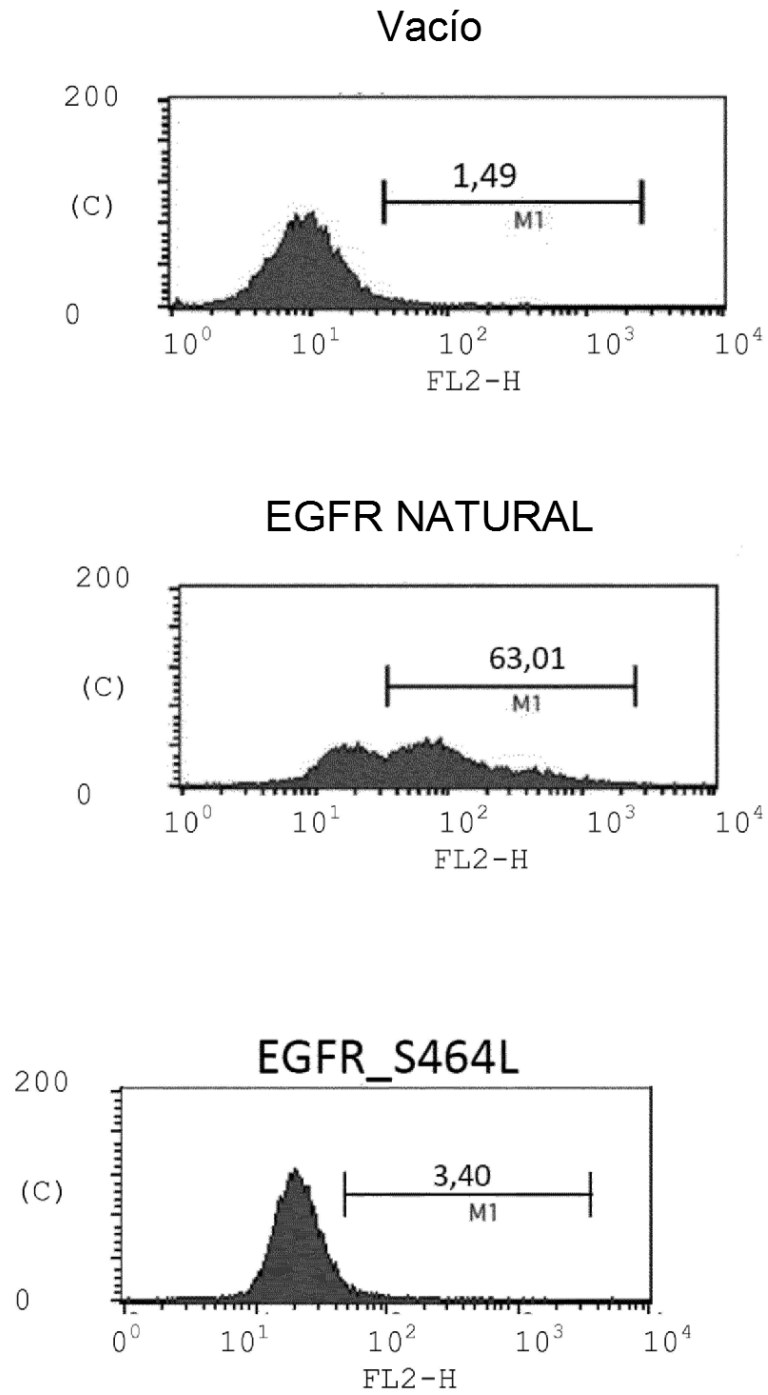


FIG. 3

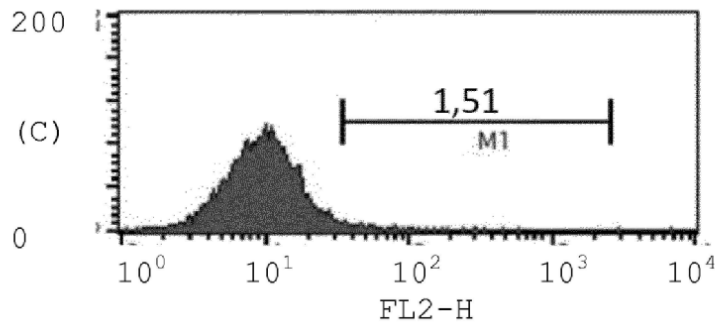
(B)



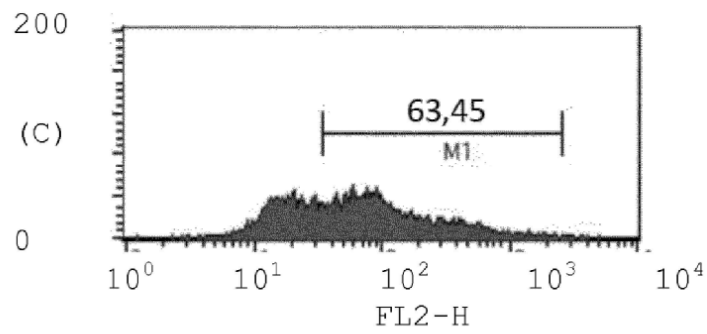
Cont. FIG. 3

(A)

Vacío



EGFR NATURAL



EGFR_G465R

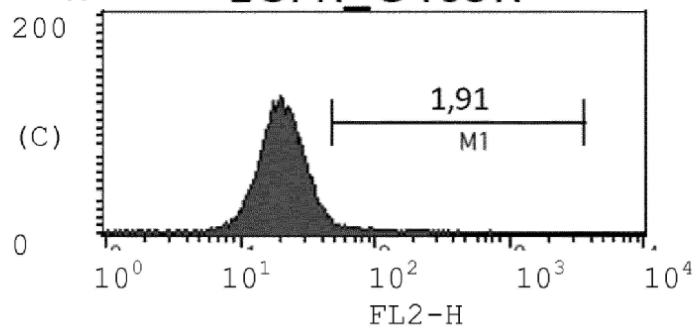
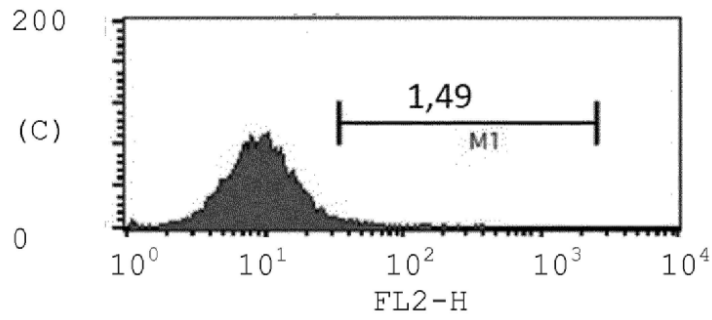


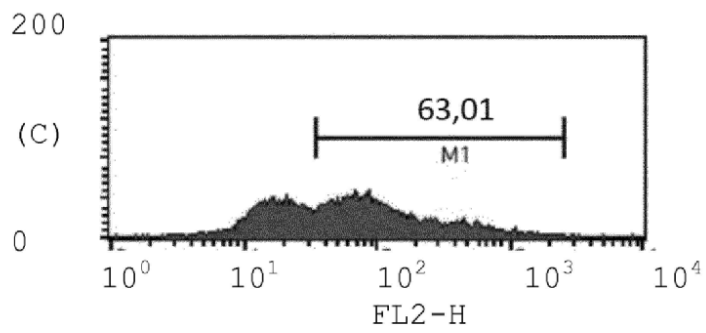
FIG. 4

(B)

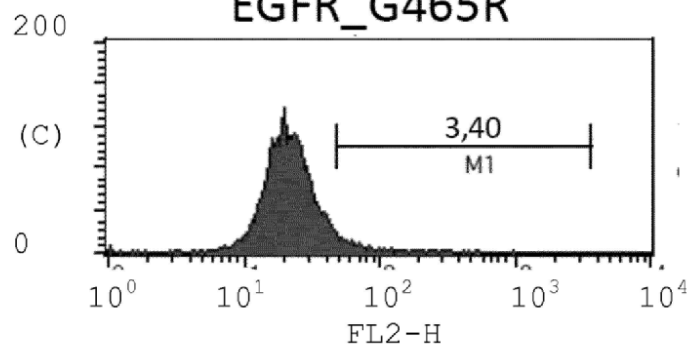
Vacío



EGFR NATURAL



EGFR_G465R



Cont. FIG. 4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 14382288 A [0126]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **MENDELSON J ; BASELGA J et al.** Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol*, 2006, vol. 33, 369-38 [0002] [0125]
- **LYNCH TJ et al.** Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004, vol. 350, 2129-2139 [0002] [0125]
- **MISALE et al.** Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, 2012, vol. 486 (532-536 [0008]
- **MONTAGUT et al.** Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nature Medicine*, 2012, vol. 18, 221-223 [0009]
- **VOIGT et al.** Functional Dissection of the Epidermal Growth Factor Receptor Epitopes Targeted by Panitumumab and Cetuximab. *Neoplasia*, 2012, vol. 14 (11), 1023-1031 [0010] [0125]
- **KARAPETIS et al.** K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2008, vol. 359, 1757-1765 [0091] [0125]
- **EISENHAUER et al.** New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 2009, vol. 45 (2), 228-247 [0112] [0125]
- **DIAZ et al.** The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*, 2012, vol. 486, 537-40 [0113] [0125]
- **SALIDO et al.** Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2011, vol. 6, 21-7 [0116] [0125]
- **MISALE et al.** Blockade of egfr and mek intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-egfr therapies in colorectal cancer. *Sci Transl Med*, 2014, vol. 6, 224ra226 [0119] [0125]
- **MISALE S et al.** Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, 2012, vol. 486, 532-6 [0121]
- **MISALE S; ARENA S et al.** Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Sci Transl Med*, 2014, vol. 6, 224ra26 [0121]
- **MISALE et al.** Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, 2012, vol. 486, 532-536 [0125]
- **MONTAGUT et al.** Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nature medicine*, 2012, vol. 18, 221-223 [0125]