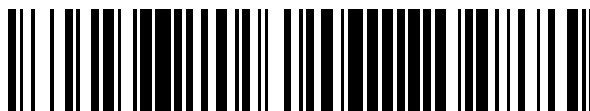


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

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

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **11.09.2019 EP 2592155**

54 Título: **Mutaciones en EGFR**

30 Prioridad:

04.06.2004 US 577425 P

10.12.2004 US 635344 P

28.03.2005 US 666068 P

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

26.03.2020

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

SESHAGIRI, SOMASEKAR

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 564 127 T5

DESCRIPCIÓN

Mutaciones en EGFR

5 Campo de la invención

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

10 Antecedentes de la invención

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

Varias neoplasias humanas están asociadas a expresión aberrante o sobre-expresión de EGFR y/o sobre-expresión de sus ligandos específicos, por ejemplo, el factor de crecimiento transformante α (Gullick, Br Med Bull 1991, 47:87-98; Modijtahedi y Dean, Int J Oncol 1994, 4:277-96; Salomon et al., Crit Rev Oncol Hematol 1995; 19:183-232). La sobre-expresión de EGFR se ha asociado a un pronóstico adverso en varios cánceres humanos, incluyendo NSCLC. En algunos casos, la sobre-expresión de EGFR tumoral se ha correlacionado tanto con quimio-resistencia como a un mal pronóstico (Lei et al., Anticancer Res 1999; 19:221-8; Veale et al., Br J Cancer 1993; 68:162-5). Estas observaciones sugieren que agentes que inhiban de forma eficaz la activación del receptor EGFR y la posterior señalización corriente abajo pueden tener actividad clínica en varios cánceres humanos, incluyendo NSCLC.

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

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

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

Sumario de la invención

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

La presente invención también proporciona métodos, tal como se definen en las reivindicaciones, para identificar un tumor de cáncer pulmonar no microcítico que es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR.

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

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

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

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

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

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

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

35

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 9 ilustra mutaciones en los exones 20 y 21 de las secuencias génica y proteica de EGFR. Los cambios de aminoácido y nucleótido, y las inserciones, están en fuente negrita, subrayada mientras que las deleciones se muestran como guiones (-).

5 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

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

Se secuenciaron muestras de aproximadamente 250 pacientes que participaron en un ensayo clínico en fase III doble ciego, aleatorizado mencionado como Tribute, para mutaciones que existen en los exones 18-21 de EGFR. Tribute estudió 1.079 pacientes en aproximadamente 150 centros en los Estados Unidos que tenían NSCLC confirmado de forma histológica que no habían recibido quimioterapia previa, comparando erlotinib + quimioterapia (carboplatino/paclitaxel) con quimioterapia en solitario. Los pacientes recibieron paclitaxel (200 mg/m² en infusión i.v. de 3 horas) seguido por carboplatino (AUC = 6 mg/ml x minuto infundido en 15-30 minutos usando la fórmula de Calvert) con o sin erlotinib (100 mg/día p.o. en escala hasta 150 mg/día para pacientes tolerantes). Las muestras de tumor, los bloques integrados en parafina fijados con formalina o portaobjetos sin tefir, de aproximadamente 250 pacientes, recogidas del ensayo Tribute, se enriquecieron para células tumorales por micro-disección con captura láser seguida por extracción de ADN. Se amplificaron los exones 18-21 por PCR anidada y se obtuvieron secuencias bidireccionales de cada producto de PCR usando química con terminador de colorante fluorescente. Las mutaciones descubiertas a partir de la secuenciación se muestran en la tabla 1:

Tabla 1

mutación en la proteína	mutación en el ácido nucleico	exón
G719A	2402G>C	18
G719C	2401G>T	18
G719S	2401G>A	18
E746-R748 del	2482-2490 del GGAATTAAGA (SEC ID N.º 32)	19
E746-A750 del	2481-2495 del GGAATTAAGAGAAGC (SEC ID N.º 33)	19
E746-R748 del	2482-2490 del GAATTAAGA	
E749Q	2491G>C	
A750P	2494G>C	19
L747-E749 del	2485-2493 del TTAAGAGAA	
A750P	494G>C	19
L747S	2486-2503 del TAAGAGAAGCAACATCTC	
R748-P753 del	(SEC ID N.º 34)	19
L747-S752 del	2485-2502 del TTAAGAGAAGCAACATCT	
E746V	2483A>T	19
L747-T751 del ins S	2486-2494 del TAAGAGAAGCAA (SEC ID N.º 36)	19
	2499-2522 del ATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAAT	19
S752-I759 del	(SEC ID N.º 37)	
M766-A767 Al ins	2544-2545 ins GCCATA	20
S768-V769 SVA ins	2554-2555 ins CCAGCGTGG (2556C>T silenciosa)	20
L858R	2819T>G	21
G719C	2401G>T	18
S768I	2549G>T {2607G>A SNP silenciosa}	20
G719C	2401G>T	18
V765M	2539G>A	20
S768I	2549G>T	20
A755V	2510C>T	19
L747S	2486T>C	19
E746K	2482G>A	19
S752-I759 del	(SEC ID N.º 37)	
P772-H773 V ins	2561-2562 ins GGT	20
L858P	2819T>C	21
L861Q	2576T>A	21
P772-H773 NS ins	2562-2563 ins AACTCC	
H773Y	2563C>T	20

(continuación)

mutación en la proteína	mutación en el ácido nucleico	exón
T790M	2615C>T	20
L858R	2819T>G	21
S784F		21
L858R		21
ins= inserción del= delección		

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

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

Los resultados del análisis se resumen en la tabla 2.

20

Tabla 2

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

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

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

40 Se secuenciaron los exones de EGFR 18-21 de una línea de células tumorales H1975 que mostraba resistencia a tratamiento con erlotinib y se descubrió que incorporaban una mutación T790M en combinación con una mutación L858R. Por consiguiente, la presente descripción proporciona adicionalmente un método para determinar el pronóstico de un paciente que tiene un tumor, que comprende determinar en una muestra de dicho tumor la presencia o ausencia de la mutación de EGFR T790M mediante lo cual la presencia de dicha mutación de EGFR T790M indica peor pronóstico en comparación con la ausencia de dicha mutación de EGFR T790M. Además, se proporcionó un método para identificar pacientes que tienen un tumor que es menos sensible a terapia de un inhibidor de EGFR tal como erlotinib o gefitinib, sea en combinación con quimioterapia o no, que comprende

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

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

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

En una realización particular, la actividad inhibidora de un compuesto de ensayo puede determinarse in vitro mediante la cantidad de inhibición de la fosforilación de un sustrato exógeno (por ejemplo, copolímero aleatorio Lys₃-Gastrina o poliGluTyr (4:1) (I. Posner et. al., J. Biol. Chem. 267 (29), 20638-47 (1992)) en tirosina por la quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico mediante un compuesto de ensayo respecto a un control. Se preincuba EGFR mutante T790M humano soluble purificado (96 ng) en un tubo de microfuga con EGF (2 µg/ml) en tampón de fosforilación + vanadato (PBV: HEPES 50 mM, pH 7,4; NaCl 125 mM; MgCl₂ 24 mM; ortovanadato sódico 100 µM), en un volumen total de 10 µl, durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. El compuesto de ensayo, disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), se diluye en PBV, y se mezclan 10 µl con la mezcla EGFR mutante/EGF, y se incuba durante 10-30 minutos a 30 °C. La reacción de fosforilación se inicia mediante la adición de 20 µl de mezcla de ³³P-ATP/sustrato (Lys₃-Gastrina 120 µM (secuencia en código de una letra para los aminoácidos, KKKGPWLEEEEEAYGWLDF - SEC ID N.º 38), Hepes 50 mM pH 7,4, ATP 40 µM, 2 µCi γ-[³³P]-ATP) a la mezcla de EGFR mutante/EGF y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 µl de solución de detención (EDTA 0,5 M, pH 8; ATP 2 mM) y 6 µl de HCl 2N. Los tubos se centrifugan a 14.000 RPM, 4 °C, durante 10 minutos. Se pipetea 35 µl de sobrenadante de cada tubo en un círculo de 2,5 cm de papel Whatman P81, se lava abundantemente cuatro veces en ácido acético al 5 %, 1 litro por lavado, y después se seca al aire. Esto provoca la unión del sustrato al papel con pérdida de ATP libre en el lavado. El [³³P] incorporado se mide por recuento de centelleo líquido. La incorporación en ausencia de sustrato (por ejemplo, Lys₃-Gastrina) se sustrae de todos los valores como fondo y se calcula el porcentaje de inhibición respecto a controles sin compuesto de ensayo presente. Dichos ensayos, realizados con un intervalo de dosis de compuestos de ensayo, permiten la determinación de un valor de CI₅₀ aproximado para la inhibición in vitro de la actividad quinasa de EGFR mutante T790M.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método como se define en las reivindicaciones para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible a tratamiento, que comprende determinar la presencia de un gen EGFR mutado o proteína EGFR mutada en una muestra de dicho tumor, donde dicha mutación está localizada en los exones 18-21 de EGFR, mediante lo cual la presencia de un gen EGFR mutando proteína EGFR mutada indica que el tumor es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR. El tumor es un tumor de cáncer pulmonar no microcítico. En una realización, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo tal como ErbituxTM (cetuximab, Imclone Systems Inc.) y ABX-EGF (panitumumab, Abgenix, Inc.). En otra realización, el inhibidor de EGFR es una molécula pequeña que compite con ATP tal como TarcevaTM (erlotinib, OSI Pharmaceuticals), IressaTM (gefitinib, Astra-Zeneca), tirfostinas descritas por Dvir, et al., J Cell Biol., 113:857-865 (1991); compuestos tricíclicos de pirimidina descritos en la patente de Estados Unidos 5.679.683; el compuesto 6-(2,6-diclorofenil)-2-(4-(2-dietilaminoetoxi)fenilamino)-8-metil-8H-pirido(2,3-d)pirimidin-7-ona (conocido como PD166285) descrito en Panek, et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283, 1433-1444 (1997).

En otro aspecto de la descripción. Se proporciona un método para identificar una mutación EGFR en una muestra, que comprende poner en contacto ácido nucleico de dicha muestra con una sonda de ácido nucleico que es capaz

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

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

Como alternativa, el ácido nucleico del gen EGFR amplificado o fragmento puede analizarse para la detección de mutaciones usando detección de mutación enzimática (EMD) (Del Tito et al, Clinical Chemistry 44:731-739, 1998). EMD usa la endonucleasa VII resolvasa T₄ de bacteriófago, que explora a lo largo de ADN bicatenario hasta que detecta y escinde distorsiones estructurales causadas por desapareamiento de pares de bases que provocan mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. La detección de dos fragmentos cortos formados por escisión con resolvasa, por ejemplo por electroforesis en gel, indica la presencia de una mutación. Los beneficios del método EMD son un único protocolo para identificar mutaciones puntuales, deleciones, e inserciones ensayadas directamente a partir de reacciones de PCR, lo que elimina la necesidad de purificación de la muestra, acorta el tiempo de hibridación, y aumenta la relación señal a ruido. Pueden ensayarse mezclas mixtas que contienen hasta un exceso de 20 veces de ADN normal y fragmentos de hasta 4 kb de tamaño. Sin embargo, la exploración EMD no identifica cambios de bases particulares que existen en muestras positivas a mutación, lo que requiere procedimientos adicionales de secuenciación para identificar la mutación si fuera necesario. La enzima CEL I puede usarse de forma similar a la endonucleasa VII resolvasa T₄ como se demuestra en el documento US5869245.

Otro kit simple para detectar las mutaciones EGFR de la descripción es una tira de ensayo de hibridación inversa similar a Haemochromatosis StripAssay™ (Viennalabs <http://www.bamburghmarrsh.com/pdf/4220.pdf>) para la detección de múltiples mutaciones en genes HFE, TFR2 y FPN1 que causan hemocromatosis. Dicho ensayo se basa en hibridación específica de secuencia después de amplificación por PCR. Para ensayos de una única mutación, puede aplicarse un sistema de detección basado en microplaca, mientras que para ensayos de múltiples mutaciones, pueden usarse tiras de ensayo como "macro-series". Los kits pueden incluir reactivos listos para su uso para preparación de la muestra, amplificación y detección de mutaciones. Protocolos de amplificación combinados proporcionan comodidad y permiten el ensayo de muestras con volúmenes muy limitados. Usando el formato directo StripAssay, que ensaya veinte y más mutaciones, se puede completar en menos de cinco horas sin equipo costoso. El ADN se aísla de una muestra y se amplifica el gen EGFR (o exones 18-21 o KDR o segmentos del mismo) in vitro (por ejemplo, PCR) y se marca con biotina, preferiblemente en una única reacción de amplificación ("combinada"). Los productos de PCR se hibridan de forma selectiva a sondas oligonucleotídicas (específicas de tipo silvestre y mutante) inmovilizadas en un soporte sólido tal como una tira de ensayo en que las sondas se inmovilizan como líneas o bandas paralelas. Los amplicones biotinilados unidos se detectan usando estreptavidina-fosfatasa alcalina y sustratos de color. Dicho ensayo puede detectar todos o cualquier subconjunto de las mutaciones de la tabla 1. Con respecto a una banda de sonda mutante particular, son posibles uno de tres patrones de señalización: (i) una banda solamente para la sonda de tipo silvestre que indica EGFR normal, (ii) bandas para la sonda tanto de tipo silvestre como mutante que indica genotipo heterocigótico y, (iii) bandas solamente para la sonda mutante que indica genotipo EGFR mutante homocigótico. Por consiguiente, se proporciona adicionalmente un método para detectar mutaciones EGFR de la descripción, que comprende aislar ácido nucleico de una muestra, amplificar el gen EGFR, o fragmento del mismo (por ejemplo, la KDR o exones 18-21 o más pequeño) de modo que el ácido nucleico amplificado comprende un ligando, poner en contacto el gen EGFR amplificado fragmento con una sonda que comprende un compañero de unión detectable al ligando y la sonda es capaz de hibridar específicamente a una mutación EGFR, y después detectar la hibridación de dicha sonda a dicho gen EGFR o fragmento amplificado. En una realización particular, el ligando es biotina y el compañero de unión comprende avidina o estreptavidina. En una realización particular, el compañero de unión es estreptavidina-fosfatasa alcalina que es detectable con sustratos de color. En una realización particular, las sondas se inmovilizan, por ejemplo, en una tira de ensayo, donde las sondas complementarias a diferentes mutaciones se separan entre sí. Como alternativa, el ácido nucleico amplificado se marca con un radioisótopo en cuyo caso la sonda no tiene que comprender un ligando.

Las muestras de tumor también se analizaron para mutaciones en KRAS (mencionado como p21a). Las mutaciones particulares detectadas en el exón 1 son: G12C; G12A; G12D; G12R; G12S; G12V; G13C; G13D que se

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

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

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

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

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

<5pEGFR.ex18.out> CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC (SEC ID N.º 39)
 <3pEGFR.ex18.out> GAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC (SEC ID N.º 40)
 <5pEGFR.ex19.out> GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC (SEC ID N.º 41)
 <3pEGFR.ex19.out> CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG (SEC ID N.º 42)
 <5pEGFR.ex20.out> CCATGAGTACGTATTTTGAAGCTC (SEC ID N.º 43)
 <3pEGFR.ex20.out> CATATCCCATGGCAAACCTTGC (SEC ID N.º 44)
 <5pEGFR.ex21.out> CTAACGTTCCGACCCATAAGTCC (SEC ID N.º 45)
 <3pEGFR.ex21.out> GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG (SEC ID N.º 46)
 <5pEGFR.ex18.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (SEC ID N.º 47)
 <3pEGFR.ex18.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (SEC ID N.º 48)
 <5pEGFR.ex19.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCCCTTAGGTGCGGCTCCACAGC (SEC ID N.º 49)
 <3pEGFR.ex19.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCATTTAGGATGTGGAGATGAGC (SEC ID N.º 50)
 <5pEGFR.ex20.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAACCTCAAGATCGCATTTCATGC (SEC ID N.º 51)
 <3pEGFR.ex20.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCGAAACTCTTGCTATCCAGGAG (SEC ID N.º 52)
 <5pEGFR.ex21.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAGCCATAAGTCTCGACGTGG (SEC ID N.º 53)
 <3pEGFR.ex21.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCATCCTCCCCTGCATGTGTTAAAC (SEC ID N.º 54)

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

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

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

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

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

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

55 Secuencias de ADN del gen EGFR que se han amplificado mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa también pueden detectarse usando sondas específicas de alelo. Estas sondas son oligómeros de ácido nucleico, cada uno de los cuales contiene una región de la secuencia génica de EGFR que alberga una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede ser de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, correspondiente a una parte de la secuencia génica de EGFR. Mediante el uso de una batería de dichas sondas específicas de alelo, pueden detectarse productos de amplificación de PCR para identificar la presencia de una mutación previamente identificada en el gen EGFR. La hibridación de sondas específicas de alelo con secuencias amplificadas de EGFR puede realizarse, por ejemplo, en un filtro de nylon. La hibridación a una sonda particular en condiciones rigurosas de hibridación indica la presencia de la misma mutación en el tejido tumoral que en la sonda específica de alelo.

65 También puede detectarse alteración de genes EGFR de tipo silvestre detectando alteración de la proteína EGFR de tipo silvestre. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales inmunorreactivos con EGFR para explorar un

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplos

65 **Ejemplo 1** Preparación de portaobjetos - desparafinización y tinción

Se sumergieron secciones en las siguientes soluciones:

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

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

Materiales:

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

35 Procedimientos:

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

Ejemplo 3 Amplificación por PCR

50 Cebadores de PCR:

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

- 55 <5pEGFR.ex18.out> CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC (SEC ID N.º 39)
- <3pEGFR.ex18.out> GAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC (SEC ID N.º 40)
- <5pEGFR.ex19.out> GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC (SEC ID N.º 41)
- <3pEGFR.ex19.out> CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG (SEC ID N.º 42)
- 60 <5pEGFR.ex20.out> CCATGAGTACGTATTTTAAAACCTC (SEC ID N.º 43)
- <3pEGFR.ex20.out> CATATCCCATGGCAAACCTTTGC (SEC ID N.º 44)
- <5pEGFR.ex21.out> CTAACGTTCCGCCAGCCATAAGTCC (SEC ID N.º 45)
- <3pEGFR.ex21.out> GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG (SEC ID N.º 46)
- <5pEGFR.ex18.in.m13f> TGTAACGACGCGCCAGTCAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (SEC ID N.º 47)
- 65 <3pEGFR.ex18.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (SEC ID N.º 48)
- <5pEGFR.ex19.in.m13f> TGTAACGACGCGCCAGTCCCTTAGGTGCGGCTCCACAGC (SEC ID N.º 49)

ES 2 564 127 T5

<3pEGFR.ex19.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCATTTAGGATGTGGAGATGAGC (SEC ID N.º 50)
<5pEGFR.ex20.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAAGTCAAGATCGCATTTCATGC (SEC ID N.º 51)
<3pEGFR.ex20.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCGAAACTCTTGCTATCCCAGGAG (SEC ID N.º 52)
<5pEGFR.ex21.in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTCAAGCCATAAGTCCTCGACGTGG (SEC ID N.º 53)
5 <3pEGFR.ex21.in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCCATCCTCCCCTGCATGTGTTAAAC (SEC ID N.º 54)

Oligos K-Ras para PCR

10 <5pKRAS-out> TACTGGTGGAGTATTTGATAGTG (SEC ID N.º 55)
<3pKRAS-out> CTGTATCAAAGAATGGTCCTG (SEC ID N.º 56)
<5pKRA8-in.m13f> TGTAACACGACGGCCAGTTAGTGTATTAACCTTATGTG (SEC ID N.º 57)
<3pKRAS-in.m13r> CAGGAAACAGCTATGACCACCTCTATTGTTGGATCATATTTCG (SEC ID N.º 58)

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

Primera ronda de PCR:

Reacción de PCR:

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

20

Condiciones del termociclador:

25 95 °C - 3 minutos
94 °C - 30 segundos repetir 35 veces
58 °C - 30 segundos
72 °C - 1 minuto
72 °C - 8 minutos
4 °C - constantemente

30 Segunda ronda de PCR:

Reacción de PCR:

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

Condiciones del termociclador:

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

40

Aislamiento de productos de PCR:

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

50 **Ejemplo 4** Secuenciación

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

siguientes:

<m13f> TGTA AACGACGGCCAGT (SEC ID N.º 59)

<m13r> CAGGAAACAGCTATGACC (SEC ID N.º 60)

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

Mezcla de reacción:

10 5 ul de ADN (25-100 ng de producto de PCR)
6 ul de agua
1 ul de cebador diluido a 0,25 DO/100 ul con agua (m13f o m13r o cebador específico de secuencia)
2 ul de BigDye v3.1
15 6 ul de tampón de dilución (equivalente a tampón de dilución ABI 5x)

Secuenciación cíclica:

Condiciones:

20 96 °C - 2,5 minutos - desnaturalización inicial
96 °C - 10 segundos
25 50 °C - 5 segundos
30 30 °C - 4 minutos
Repetido durante un total de 25 a 50 ciclos

Limpieza de reacción:

Se retiraron los nucleótidos no incorporados usando:

35 sephadex al 8 %
500 ul en bloque de 96 pocillos Edge BioSystem
centrifugado a 750 g durante dos minutos

Análisis:

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

45 **Ejemplo 5** Respuesta a dosis

Se marcaron con epítipo construcciones de tipo silvestre y mutantes de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano usadas en este estudio en el extremo N-terminal con la secuencia señal del virus del herpes simple de gD, remplazando la secuencia señal de EGFR endógeno (Schaefer et al. 1999 J. Biol. Chem. 274, 859-866). Se sembraron células Cos7 en placas de 12 pocillos en medio de cultivo normal 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con 0,25 ug por pocillo con ADN plasmídicos de expresión (pRK5.gD.EGFR tipo silvestre, pRK5.gD.EGFR. L858R, o pRK5.gD.EGFR.del(E746-S752)) usando LipofectAMINE 2000 siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Invitrogen). Veinticuatro horas post-transfección, las células se privaron de suero durante seis horas en DMEM sin suero. Una hora antes de la estimulación, las células transfectadas se pre-incubaron con las concentraciones indicadas de erlotinib. Las células transfectadas se estimularon con TGF α 1 nM durante 10 minutos. Las células se lisaron directamente en los pocillos usando tampón de Laemmli reductor. Se detectó autofosforilación del receptor, un índice de activación del receptor EGFR por estimulación del factor de crecimiento, por transferencia de Western usando un anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado a HRP (Oncogene Sciences, AB-4). Se evaluó la eficacia de transfección usando un anticuerpo específico para la marca epitépica gD (5B6). Se evaluó el nivel de activación del receptor a partir de los autorradiogramas usando el software NIH Image. Estos datos después se usaron para general un gráfico a partir del cual se calculó la CI50 usando una función de ajuste de 4 parámetros. Como se ilustra por los resultados a continuación, erlotinib tiene una afinidad mayor por EGFR que contiene mutaciones en comparación con EGFR de tipo silvestre.

65

ES 2 564 127 T5

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

Se describen los siguientes párrafos numerados (párr.)

- 5 1. Un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible a tratamiento, que comprende determinar la presencia de un gen EGFR mutado o proteína EGFR mutada en una muestra de dicho tumor donde dicha mutación está localizada en los exones 18-21 de EGFR, mediante lo cual la presencia de un gen EGFR mutado o proteína EGFR mutada diferente a T790M indica que el tumor es susceptible a tratamiento.
- 10 2. El método del párr. 1 donde dicho tratamiento es un agente quimioterapéutico.
- 15 3. El método del párr. 2 donde dicho agente quimioterapéutico es uno o más de citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'- desoxiuridina, gemcitabina, hidroxurea, metotrexato; bleomicina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, mitoxantrona; camptotecina, topotecán; tenipósido; colcemid, colchicina, paclitaxel, vinblastina vincristina o tamoxifeno.
- 20 4. El método del párr. 2 donde dicho agente quimioterapéutico es carboplatino y/o paclitaxel.
- 25 5. El método del párr. 1 donde dicho tratamiento es un inhibidor de EGFR.
- 30 6. El método del párr. 5 donde dicho inhibidor de EGFR es uno o más de cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
- 35 7. El método del párr. 5 donde dicho inhibidor de EGFR es erlotinib.
- 40 8. El método del párr. 1 donde dicha mutación está localizada en el dominio quinasa de EGFR.
- 45 9. El método del párr. 8 donde dicha mutación es al menos una de G719A, G719C, G719S, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, H773Y, S768I, S784F, L858R, L858P, L861Q, E746-A748 del, E746-A750 del, E746-R748 del, L747-E749 del, R748-P753 del, L747-S752 del, E746V, L747-T751 del, L747-P753 del, S752-I759 del, M766- A767 AI ins, S768-V769 SVA ins, P772-H773 NS ins y P772-H773 V ins.
- 50 10. El método del párr. 8 donde dicha mutación es al menos una de G719A, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, S768I, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 AI ins, S768-V769 SVA ins y P772-H773 NS ins.
- 55 11. El método del párr. 8 donde dicha mutación es al menos una de 2402G>C; 2401G>T; 2401G>A; 2482G>A; 2486T>C; 2491G>C; 2494G>C; 2510C>T; 2539G>A; 2556C>T; 2563C>T; 2576T>A; 2819T>G; 2819T>C; 2482-2490 del; 2481-2495 del; 2482-2490 del; 2485-2493 del; 2494G>C; 2486-2503 del; 2485-2502 del; 2483A>T; 2486-2494del; 2499-2522 del; 2544-2545 ins GCCATA; 2554-2555 ins CCAGCGTGG; 2561-2562 ins GGT; y 2562-2563 ins AACTCC.
- 60 12. El método del párr. 8 donde dicha mutación es al menos una de 2402G>C; 2482G>A; 2486T>C; 2491G>C; 2494G>C; 2510C>T; 2539G>A; 2549G>T; 2563C>T; 2819T>C; 2482-2490 del; 2486-2503 del; 2544-2545 ins GCCATA; 2554-2555 ins CCAGCGTGG; y 2562-2563 ins AACTCC.
- 65 13. Un método para identificar una mutación EGFR en una muestra, que comprende poner en contacto el ácido nucleico de dicha muestra con una sonda de ácido nucleico que es capaz de hibridar específicamente con el ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada, o fragmento de la misma que incorpora una mutación y detectar dicha hibridación.
- 70 14. El método del párr. 13 donde dicha mutación está en el dominio quinasa de EGFR.
- 75 15. El método del párr. 13 donde dicha mutación EGFR es al menos una de 2402G>C; 2401G>T; 2401G>A; 2482G>A; 2486T>C; 2491G>C; 2494G>C; 2510C>T; 2539G>A; 2556C>T; 2563C>T; 2576T>A; 2615C>T; 2819T>G; 2819T>C; 2482-2490 del ; 2481-2495 del; 2482-2490 del; 2485-2493 del; 2494G>C; 2486-2503 del; 2485-2502 del; 2483A>T; 2486-2494 del; 2499-2522 del; 2544-2545 ins GCCATA; 2554-2555 ins CCAGCGTGG; 2561-2562 ins GGT; y 2562-2563 ins AACTCC.
- 80 16. El método del párr. 13 donde dicha mutación EGFR es al menos una de 2402G>C; 2482G>A; 2486T>C; 2491G>C; 2494G>C; 2510C>T; 2539G>A; 2549G>T; 2563C>T; 2615C>T 2819T>C; 2482-2490 del; 2486-2503 del; 2544-2545 ins GCCATA; 2554-2555 ins CCAGCGTGG; y 2562-2563 ins AACTCC.
- 85 17. El método del párr. 13 donde dicha sonda está marcada de forma detectable.

18. El método del párr. 13 donde dicha sonda es un oligómero antisentido.
- 5 19. El método del párr. 13 donde el gen EGFR o fragmento del mismo en dicha muestra de ácido nucleico se amplifica y pone en contacto con dicha sonda.
- 10 20. El uso de agente antineoplásico en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor que tiene una mutación EGFR, donde dicha mutación EGFR en dicho tumor es al menos una de G719A, G719C, G719S, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, H773Y, S768I, S784F, L858R, L858P, L861Q, E746-A748 del, E746-A750 del, E746-R748 del, L747-E749 del, R748-P753 del, L747-S752 del, E746V, L747-T751 del, L747-P753 del, S752- I759 del, M766-A767 Al ins, S768-V769 SVA ins, P772-H773 NS ins y P772-H773 V ins.
- 15 21. El uso del párr. 20 donde dicho agente antineoplásico es un agente quimioterapéutico.
22. El uso del párr. 20 donde dicho agente antineoplásico e un inhibidor de EGFR.
- 20 23. El uso del párr. 21 donde dicho agente quimioterapéutico es uno o más de citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, bleomicina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, mitoxantrona, camptotecina, topotecán; tenipósido; colcemid, colchicina, paclitaxel, vinblastina, vincristina, o tamoxifeno.
- 25 24. El uso del párr. 21 donde dicho agente quimioterapéutico es uno o más de metotrexato; bleomicina, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, mitoxantrona, paclitaxel, vinblastina, vincristina o tamoxifeno.
- 30 25. El uso del párr. 22 donde dicho agente quimioterapéutico es uno o más de cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
- 30 26. El uso del párr. 20 donde dicha mutación EGFR es al menos una de G719A, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, S768I, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 Al ins, S768-V769 SVA ins y P772-H773 NS ins.
- 35 27. Una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con ácido nucleico que codifica una proteína EGFR mutada o fragmento de la misma que incorpora una mutación.
- 40 28. La sonda del párr. 27 donde dicha sonda es complementaria a dicho ácido nucleico que codifica la EGFR mutada o dicho fragmento de la misma.
- 40 29. La sonda del párr. 27 que tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos.
30. La sonda del párr. 27 que comprende adicionalmente un marcador detectable.
- 45 31. La sonda del párr. 27 donde dicha mutación es al menos una de G719A, G719C, G719S, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, S768I, L858R, L858P, L861Q, E746-A748 del, E746-A750 del, E746-R748 del, L747-E749 del, R748-P753 del, L747-S752 del, E746V, L747-T751 del, L747-P753 del, S752-I759 del, M766-A767 Al ins, S768- V769 SVA ins, y P772-H773 V ins.
- 50 32. La sonda del párr. 27 donde dicha mutación es al menos una de G719A, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, S768I, H773Y, S784F, T790M, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 Al ins, P772-H773 NS ins y S768-V769 SVA ins.
- 55 33. Un método para detectar un gen EGFR mutado en una muestra, que comprende amplificar dicho ácido nucleico de la muestra correspondiente al dominio quinasa de dicho gen EGFR, o un fragmento del mismo sospechoso de contener una mutación, y comparar la movilidad electroforética del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del correspondiente gen EGFR de tipo silvestre o fragmento del mismo.
34. El método del párr. 33 donde la movilidad electroforética se determina en gel de poliacrilamida.
- 60 35. Un método para identificar un tumor en un sujeto humano que es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR, que comprende (i) determinar la presencia de una proteína o gen RAS de tipo silvestre en una muestra de dicho tumor mediante lo cual la presencia de una proteína o gen RAS de tipo silvestre indica que el tumor es susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR o (ii) determinar la presencia de una proteína o gen RAS mutado en una muestra de dicho tumor mediante lo cual la ausencia de una proteína o gen RAS mutado indica que el tumores susceptible a tratamiento con un inhibidor de EGFR.
- 65 36. El método del párr. 36 donde dicha mutación RAS es al menos una de G12C; G12A; G12D; G12R; G12S;

G12V; G13C; G13D.

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

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

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

20 Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC.

25 <120> Mutaciones en EGFR

<130> CMD/FP6747802

<140> Solicitud divisional EP basada en la EP 05757355.2

30 <141> 02-06-2005

<150> EP 05757355.2

<151> 02-06-2005

35 <150> PCT/US2005/019653

<151> 02-06-2005

<150> US 60/577.425

<151> 04-06-2004

40 <150> US 60/635.344

<151> 10-12-2004

<150> US 60/666.068

<151> 28-03-2005

45 <160> 60

<210> 1

<211> 1210

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 564 127 T5

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

ES 2 564 127 T5

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

ES 2 564 127 T5

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

ES 2 564 127 T5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 564 127 T5

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

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

5

<400> 2

```

ccccggcgca ggcgggccgc agcagcctcc gccccccgca cgggtgtgagc 50
gcccgacgcg gccgaggcgg ccggagtccc gagctagccc cggcggccgc 100
cgccgcccag accggacgac aggccacctc gtcggcgtcc gcccgagtcc 150
ccgcctcgcc gccaacgcca caaccaccgc gcacggcccc ctgactccgt 200
ccagtattga tcgggagagc cggagcagc tcttcgggga gcagcgatgc 250
gaccctccgg gacggccggg gcagcgtcc tggcgtgct ggctgcgctc 300
tgcccggcga gtcgggctct ggaggaaaag aaagtttgcc aaggcacgag 350
taacaagctc acgcagttgg gcacttttga agatcatttt ctccagcctcc 400
agaggatggt caataactgt gagtggtcc ttgggaattt ggaaattacc 450
tatgtgcaga ggaattatga tcttccttc ttaaagacca tccaggaggt 500
ggctggttat gtcctcattg cctcaacac agtggagcga attcctttgg 550
aaaacctgca gatcatcaga ggaaatatgt actacgaaaa ttctatgcc 600
ttagcagtct tatctaacta tgatgcaaat aaaaccggac tgaaggagct 650
gcccattgaga aatttacagg aaatcctgca tggcgcctgt cggttcagca 700
acaacctgac cctgtgcaac gtggagagca tccagtggcg ggacatagtc 750
agcagtgact ttctcagcaa catgtcgatg gacttocaga accacctggg 800
cagctgcaa aagtgtgatc caagctgtcc caatgggagc tgctggggtg 850
caggagagga gaactgccag aaactgacca aaatcatctg tgcccagcag 900
tgctccgggc gctgccgtgg caagtcccc agtgactgct gccacaacca 950
gtgtgctgca ggctgcacag gccccggga gacgcactgc ctggtctgcc 1000
gcaaatccg agacgaagcc acgtgcaagg acacctgcc cccactcatg 1050
    
```

10

ES 2 564 127 T5

ctctacaacc ccaccacgta ccagatggat gtgaaccccg agggcaaata 1100
 cagctttggt gccacctgog tgaagaagtg tccccgtaat tatgtggtga 1150
 cagatcacgg ctcgtgcgtc cgagcctgtg gggccgacag ctatgagatg 1200
 gaggaagacg gcgtccgcaa gtgtaagaag tgcgaagggc cttgccgcaa 1250
 agtgtgtaac ggaataghta ttggtgaatt taaagactca ctctccataa 1300
 atgctacgaa tattaaacac ttcaaaaact gcacctccat cagtggcgat 1350
 ctccacatcc tgccggtggc atttaggggt gactccttca cacatactcc 1400
 tcctctggat ccacaggaac tggatattct gaaaaccgta aaggaaatca 1450
 cagggttttt gctgattcag gcttggcctg aaaacaggac ggacctccat 1500
 gcctttgaga acctagaaat catacgcggc aggaccaagc aacatggtca 1550
 gttttctctt gcagtcgtca gcctgaacat aacatccttg ggattacgct 1600
 ccctcaagga gataagtgat ggagatgtga taatttcagg aaacaaaaat 1650
 ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa aaactgtttg ggacctccgg 1700
 tcagaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaacagc tgcaaggcca 1750
 caggccaggt ctgccatgcc ttgtgctccc ccgagggctg ctggggcccg 1800
 gagccacagg actgcgtctc ttgccggaat gtcagccgag gcagggaatg 1850
 cgtggacaag tgcaaccttc tggaggggtga gccaaaggag tttgtggaga 1900
 actctgagtg catacagtg caccagagt gcctgcctca ggccatgaac 1950
 atcacctgca caggacgggg accagacaac tgtatccagt gtgccacta 2000
 cattgacggc ccccactgcg tcaagacctg cccggcagga gtcattggag 2050
 aaaacaacac cctggtctgg aagtaacgag acgccggcca tgtgtgccac 2100
 ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actgggccag gtcttgaagg 2150
 ctgtccaacg aatgggccta agatcccgtc catcgccact gggatggtgg 2200
 gggccctcct ottgctgctg gtggtggccc tggggatcgg cctcttcctg 2250
 cgaaggcgcc acatcgttcg gaagcgcacg ctgcccggagc tgctgcagga 2300
 gagggagctt gtggagcctc ttacaccagc tggagaagct cccaaccaag 2350
 ctctcttgag gatcttgaag gaaactgaat tcaaaaagat caaagtgctg 2400
 ggctccggtg cgttcggcac ggtgtataag ggactctgga tcccagaagg 2450
 tgagaaagtt aaaattcccg tcgctatcaa ggaattaaga gaagcaacat 2500
 ctccgaaagc caacaaggaa atcctcgatg aagcctacgt gatggccagc 2550
 gtggacaacc cccacgtgtg ccgctgctg ggcatctgcc tcacctccac 2600
 cgtgcagctc atcacgcagc tcatgccctt cggctgcctc ctggactatg 2650
 tccgggaaca caaagacaat attggctccc agtacctgct caactggtgt 2700

ES 2 564 127 T5

gtgcagatcg caaagggcat gaactacttg gaggaccgtc gcttggtgca 2750
 ccgcgacctg gcagccagga acgtactggt gaaaacaccg cagcatgtca 2800
 agatcacaga ttttgggctg gccaaactgc tgggtgcgga agagaaagaa 2850
 taccatgcag aaggaggcaa agtgcctatc aagtggatgg cattggaatc 2900
 aattttacac agaatctata cccaccagag tgatgtctgg agctacgggg 2950
 tgaccgtttg ggagttgatg acctttggat ccaagccata tgacggaatc 3000
 cctgccagcg agatctcctc catcctggag aaaggagaac gcctccctca 3050
 gccaccataa tgtaccatcg atgtctacat gatcatggtc aagtgcctgga 3100
 tgatagacgc agatagtcgc ccaaagtcc gtgagttgat catcgaattc 3150
 tccaaaatgg cccgagaccc ccagcgtac cttgtcattc agggggatga 3200
 aagaatgcat ttgccaaagt ctacagactc caacttctac cgtgccctga 3250
 tggatgaaga agacatggac gacgtggtgg atgccgacga gtacctatc 3300
 ccacagcagg gcttcttcag cagccctcc acgtcacgga ctcccctcct 3350
 gagctctctg agtgcaacca gcaacaattc caccgtggct tgcaattgata 3400
 gaaatgggct gcaaagctgt cccatcaagg aagacagctt cttgcagcga 3450
 tacagctcag accccacagg cgccttgact gaggacagca tagacgacac 3500
 cttcctccca gtgcctgaat acataaacca gtccttccc aaaaggcccg 3550
 ctggctctgt gcagaatcct gtctatcaca atcagcctct gaaccccgcg 3600
 cccagcagag acccacacta ccaggacccc cacagcactg cagtgggcaa 3650
 ccccgagtat ctcaacactg tccagcccac ctgtgtcaac agcacattcg 3700
 acagccctgc cactggggcc cagaaaggca gccaccaaat tagcctggac 3750
 aaccctgact accagcagga cttctttccc aaggaagcca agccaaatgg 3800
 catctttaag ggctccacag ctgaaaatgc agaataccta agggtcgctc 3850
 cacaaagcag tgaatattt ggagcatgac cacggaggat agtatgagcc 3900
 ctaaaaatcc agactctttc gatacccagg accaagccac agcaggtcct 3950
 ccatcccaac agccatgccc gcattagctc ttagaccac agactggttt 4000
 tgcaacgttt acaccgacta gccaggaagt acttccacct cgggcacatt 4050
 ttgggaagtt gcattccttt gtcttcaaac tgtgaagcat ttacagaaac 4100
 gcatccagca agaattttgt ccctttgagc agaaatttat ctttcaaaga 4150
 ggtatatttg aaaaaaaaaa aaagtatatg tgaggatttt tattgattgg 4200
 ggatcttggg gtttttcatt gtcgctattg attttactt caatgggctc 4250
 ttccaacaag gaagaagctt gctggtagca cttgctacc tgagttcctc 4300

ES 2 564 127 T5

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

5 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

10 Lys Val Leu Gly Ser Gly
 1 5

<210> 4
 <211> 18

ES 2 564 127 T5

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 4
5 aaagtgctgg gctccggt 18

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

<400> 5
15 aaagtgctgt gctccggt 18

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

<400> 6

Lys Val Leu Ala Ser Gly
1 5

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

<400> 7
30 aaagtgctgg cctccggt 18

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

<400> 8

Lys Val Leu Cys Ser Gly
1 5

<210> 9
40 <211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

Glu Ile Leu Asp

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

<400> 10

ES 2 564 127 T5

gctatcaagg aattaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50

cctcgat 57

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

10 <400> 11
gctatcaaaa catctccgaa agccaacaag gaaatcctcg at 42

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

<400> 12
gctatcaagc aaccaacatc tccgaaagcc aacaaggaaa tcctcgat 48

20 <210> 13
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 13
gctatcaagg aatcgaaagc caacaaggaa atcctcgat 39

30 <210> 14
<211> 33
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 14
gctatcaagg aattaagaga agcaaccctc gat 33

35 <210> 15
<211> 57
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 15

gctatcaagg aattaagaga agcaacatct ccgaaagtca acaaggaaat 50

cctcgat 57

45 <210> 16
<211> 57
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 16

gctatcaagg aatcaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50

cctcgat 57

55 <210> 17
<211> 57
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 564 127 T5

<400> 17

gctatcaaga aattaagaga agcaacatct ccgaaagcca acaaggaaat 50

cctcgat 57

5

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

10

<400> 18

Met Ala Ser Val Asp Asn Pro
1 5

15

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

20

<400> 19
atggccagcg tggacaacc c 21

25

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

30

<400> 20
atggccatag ccagcgtgga caacccc 27

35

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

<400> 21

Met Ala Ile Ala Ser Val Asp Asn Pro
1 5

40

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

45

<400> 22
atggccagcg tggccagcgt ggataacccc 30

50

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

<400> 23

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

55

ES 2 564 127 T5

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

5
<400> 24
atggccatcg tggacaacc c 21

10
<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15
<400> 25
Met Ala Ile Val Asp Asn Pro
1 5

20
<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

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

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

30
<400> 27
ttgggctgg ccaaactg 18

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

40
<400> 28
ttgggcggg ccaaactg 18

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

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

50
<210> 30
<211> 18
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

55
<400> 30
ttgggccgg ccaaactg 18

ES 2 564 127 T5

<210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 31

Phe Gly Pro Ala Lys Leu
1 . 5

10 <210> 32
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 32
 ggaattaaga 10
 <210> 33
 <211> 15
 20 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33
 ggaattaaga gaagc 15
 25 <210> 34
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 34
 taagagaagc aacatctc 18
 <210> 35
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 35
 ttaagagaag caacatct 18
 <210> 36
 <211> 12
 <212> ADN
 45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 36
 taagagaagc aa 12
 50 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 37
 atctccgaaa gccacaagg aaat 24
 <210> 38
 <211> 19
 <212> PRT
 60 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38

ES 2 564 127 T5

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

Trp Leu Asp Phe

5 <210> 39
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 39
 caaatgagct ggcaagtgcc gtgtc 25

15 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 40
 gagtttccca aacactcagt gaaac 25

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

30 <400> 41
 gcaatatcag ccttaggtgc ggctc 25

35 <210> 42
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 42
 catagaaagt gaacatttag gatgtg 26

45 <210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 43
 ccatgagtac gtatttgaa actc 24

55 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 44
 catatcccca tggcaaactc ttgc 24

65 <210> 45
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

70 <400> 45
 ctaacgttcg ccagccataa gtcc 24

75 <210> 46
 <211> 26

ES 2 564 127 T5

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 46
 5 gctgagct caccagaat gtctgg 26

 <210> 47
 <211> 44
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <400> 47
 tgtaaacga cggccagtca agtgccgtgt cctggcacc aagc 44

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

 <400> 48
 20 caggaaacag ctatgacccc aaactcag tgaacaaag ag 42

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

 <400> 49
 30 tgtaaacga cggccagtcc ttagtgcg ctccacagc 39

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

 <400> 50
 35 caggaaacag ctatgacca ttaggatgt ggagatgagc 40

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

 <400> 51
 45 tgtaaacga cggccagtga aactcaagat cgcattcatg c 41

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

 <400> 52
 caggaaacag ctatgaccgc aaactctgc tatccagga g 41

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

 <400> 53
 60 tgtaaacga cggccagtca gccataagtc ctcgacgtgg 40

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

 65

ES 2 564 127 T5

<400> 54
 caggaaacag ctatgacca tcctcccctg catgtgtaa ac 42

5 <210> 55
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 55
 tactggtgga gtattgata gtg 23

15 <210> 56
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 56
 ctgtatcaaa gaatgtcct g 21

25 <210> 57
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 57
 tgtaaaacga cggccagtta gtgtattaac cttatgtg 38

35 <210> 58
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 58
 caggaaacag ctatgaccac ctctattggt ggatcatatt eg 42

45 <210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 59
 tgtaaaacga cggccagt 18

55 <210> 60
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 60
 caggaaacag ctatgacc 18

REIVINDICACIONES

1. Un método

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

14. El inhibidor de EGFR para uso de la reivindicación 10, en el que la presencia o la ausencia de un gen que codifica una mutación en la proteína EGFR se detecta amplificando por PCR los exones 18-21 del gen EGFR y secuenciando de forma bidireccional el producto de PCR.
- 5
15. El inhibidor de EGFR para uso de la reivindicación 10, en el que la etapa de identificación comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación E746K en la proteína EGFR o de un gen que codifica una mutación E746K en la proteína EGFR.
- 10
16. El inhibidor de EGFR para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, en el que la presencia de dicha mutación en la proteína EGFR o de dicho gen que codifica dicha mutación en la proteína EGFR indica mejor pronóstico en comparación con la expresión de la proteína EGFR de tipo silvestre.
- 15
17. El inhibidor de EGFR para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-16, que es erlotinib.

ES 2 564 127 T5

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

FIGURA 1

ES 2 564 127 T5

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

Figura 2a

ES 2 564 127 T5

GACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTA	1440
AAGGAAATCACAGGGTTTTTGTGATTAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCAT	1500
GCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTT	1560
GCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGAT	1620
GGAGATGTGATAATTTAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAA	1680
AAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGC	1740
TGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCG	1800
GAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAG	1860
TGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGC	1920
CACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAAC	1980
TGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA	2040
GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCAC	2100
CTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACG	2160
AATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTG	2220
GTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTTCGGAAGCGCACG	2280
CTGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCT	2340
CCCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTGCTG	2400
GGCTCCGGTGCCTTCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTT	2460
AAAATTCCTGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAA	2520
ATCCTCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCTG	2580
GGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTC	2640
CTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCAGTACCTGCTCAACTGGTGT	2700

Figura 2b

ES 2 564 127 T5

GTGCAGATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTG	2760
GCAGCCAGGAACGTACTGGTGAAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTG	2820
GCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATC	2880
AAGTGGATGGCATTGGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGATGTCTGG	2940
AGCTACGGGGTGACCGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGAATC	3000
CCTGCCAGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAACGCCTCCCTCAGCCACCCATA	3060
TGTACCATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGCTGGATGATAGACGCAGATAGTCGC	3120
CCAAAGTTCGGTGAGTTGATCATCGAATTCTCCAAAATGGCCCGAGACCCCCAGCGCTAC	3180
CTTGTCAATTCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCTACAGACTCCAACCTCTAC	3240
CGTGCCCTGATGGATGAAGAAGACATGGACGACGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATC	3300
CCACAGCAGGGCTTCTTCAGCAGCCCCTCCACGTCACGGACTCCCCTCCTGAGCTCTCTG	3360
AGTGCAACCAGCAACAATTCACCGTGGCTTGCATTGATAGAAATGGGC'TGCAAAGCTGT	3420
CCCATCAAGGAAGACAGCTTCTTGCAGCGATACAGCTCAGACCCACAGGGCGCCTTGACT	3480
GAGGACAGCATAGACGACACCTTCTCCAGTGCCTGAATACATAAACCAGTCCGTTCCC	3540
AAAAGGCCCGCTGGCTCTGTGCAGAATCCTGTCTATCACAAATCAGCCTCTGAACCCCGCG	3600
CCCAGCAGAGACCCACACTACCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTAT	3660
CTCAAACTGTCCAGCCCACCTGTGTCAACAGCACATTCGACAGCCC'TGCCACTGGGCC	3720
CAGAAAGGCAGCCACCAAATTAGCCTGGACAACCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCC	3780
AAGGAAGCCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTA	3840
AGGGTCGCGCCACAAAGCAGTGAATTTATTGGAGCATGACCACGGAGGATAGTATGAGCC	3900
CTAAAAATCCAGACTCTTTTCGATACCCAGGACCAAGCCACAGCAGGTCTCCATCCCAAC	3960
AGCCATGCCCCGATTAGCTCTTAGACCCACAGACTGGTTTTGCAACGTTTACACCGACTA	4020
GCCAGGAAGTACTTCCACCTCGGGCACATTTTGGGAAGTTGCATTCTTTGTCTTCAAAC	4080
TGTGAAGCATTTACAGAAACGCATCCAGCAAGAATAT'TGTCCCTTTGAGCAGAAATTTAT	4140

Figura 2c

ES 2 564 127 T5

CTTTCAAAGAGGTATATTTGAAAAAAAAAAAAAGTATATGTGAGGATTTTTATTGATTGG	4200
GGATCTTGGAGTTTTTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAG	4260
GAAGAAGCTTGCTGGTAGCAC'TTGCTACCC'TGAGTTCATCCAGGCCCAACTGTGAGCAAG	4320
GAGCACAAGCCACAAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTT	4380
CCACTGCAAAACACTAAAGATCCAAGAAGGCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTA	4440
CTGTATCAAGTCATGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGA	4500
AGAAACGGAGGGGATGGAATCTTCCTTAGACTTACTTTTTGTAAAAATGTCCCCACGGTA	4560
CTTACTCCCCACTGATGGACCAGTGGTTTTCCAGTCATGAGCGTTAGACTGACTTGT'TTGT	4620
CTTCCATTCCATTGTTTTGAAACTCAGTATGCTGCCCCGTCTTGCTGTCATGAAATCAG	4680
CAAGAGAGGATGACACATCAAATAATAACTCGGATTCCAGCCCACATTGGATTTCATCAGC	4740
AT'TTGACCAATAGCCACAGCTGAGAAATGTGGAATACCTAAGGATAGCACCGCTTTTGT	4800
TCTCGCAAAAACGTATCTCCTAATTTGAGGCTCAGATGAAATGCATCAGGTCCTTTGGGG	4860
CATAGATCAGAAGACTACAAAAATGAAGCTGCTCTGAAATCTCCTTTAGCCATCACCCCA	4920
ACCCCCAAAATTAGTTTGTGT'FACTTATGGAAGATAGTTTTCTCCTTTTACTTCACTTC	4980
AAAAGCTTTTTACTCAAAGAGTATATGTTCCCTCCAGGTCAGCTGCCCCCAAACCCCTC	5040
CTTACGCTTTTGT'CACACAAAAAGTGTCTCTGCCTTGAGTCATCTATTCAAGCACTTACAG	5100
CTCTGGCCACAACAGGGCATT'TTACAGGTGCGAATGACAGTAGCATTATGAGTAGTGTGG	5160
AATTCAGGTAGTAAATATGAAACTAGGGTTTGAAATTGATAAATGCTTTCACAACATTTGC	5220
AGATGTTTTAGAAAGAAAAAGTTCCTTCCATAAATAAATTTCTCTACAATTGGAAGATTG	5280
GAAGATTCAGCTAGTTAGGAGCCCACCTTTTTTTCCTAATCTGTGTGTGCCCTGTAACCTG	5340
ACTGGTTAACAGCAGTCCTTTGTAAAACAGTGT'TTTAAACTCTCCTAGTCAATATCCACCC	5400
CATCCAATTTATCAAGGAAGAAATGGTTCAGAAAATATTTTCAGCCTACAGTTATGTTCA	5460
GTCACACACACATACAAAATGTTCCTTTTGCTTTTAAAGTAATTTTTGACTCCCAGATCA	5520
GTCAGAGCCCCTACAGCATTGTTAAGAAAGTATTTGATTTTTTGTCTCAATGAAAAATAAAA	5580
CTATATTCATTTCCACTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

Figura 2d

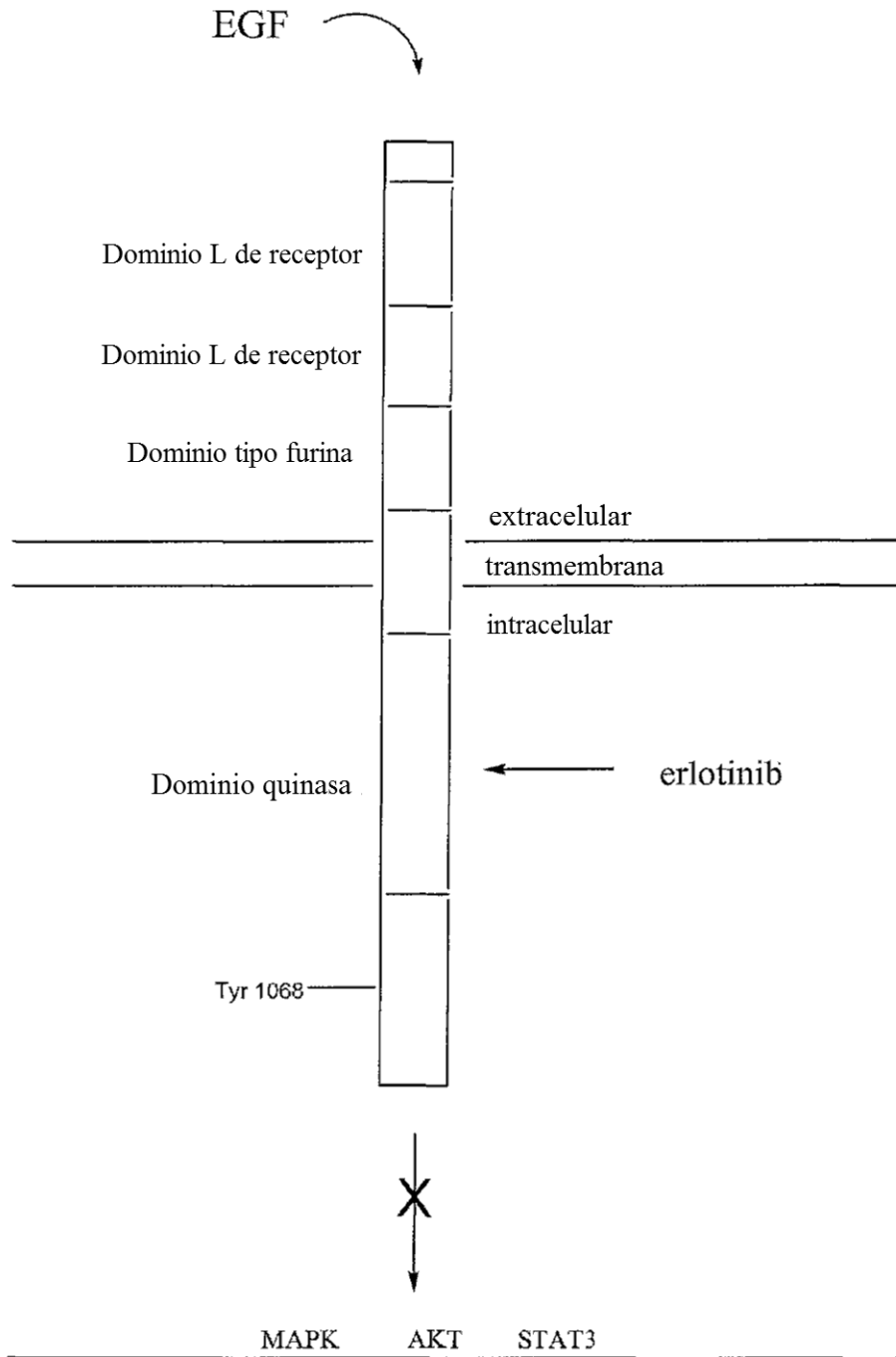


Figura 3

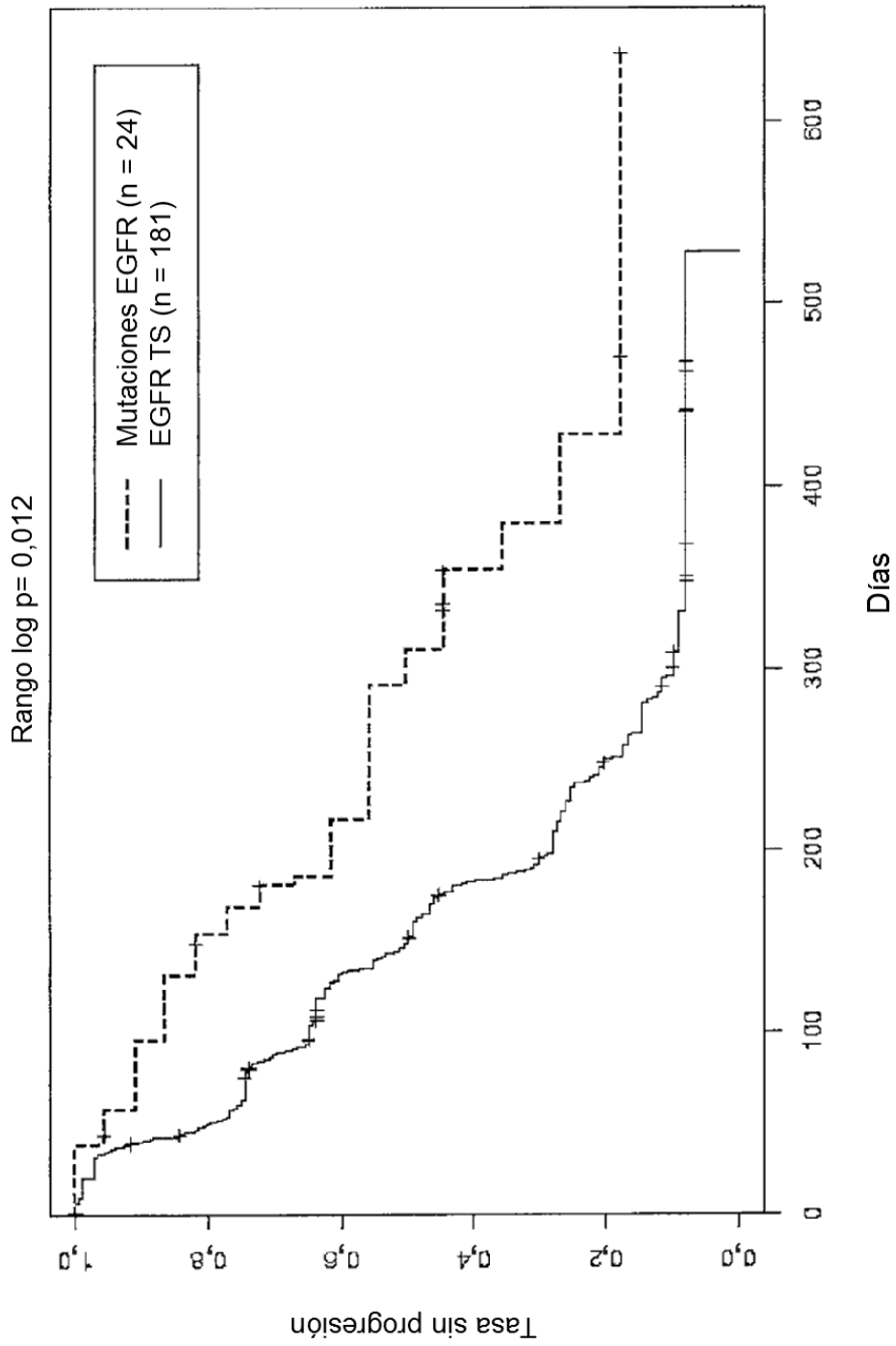


Figura 4

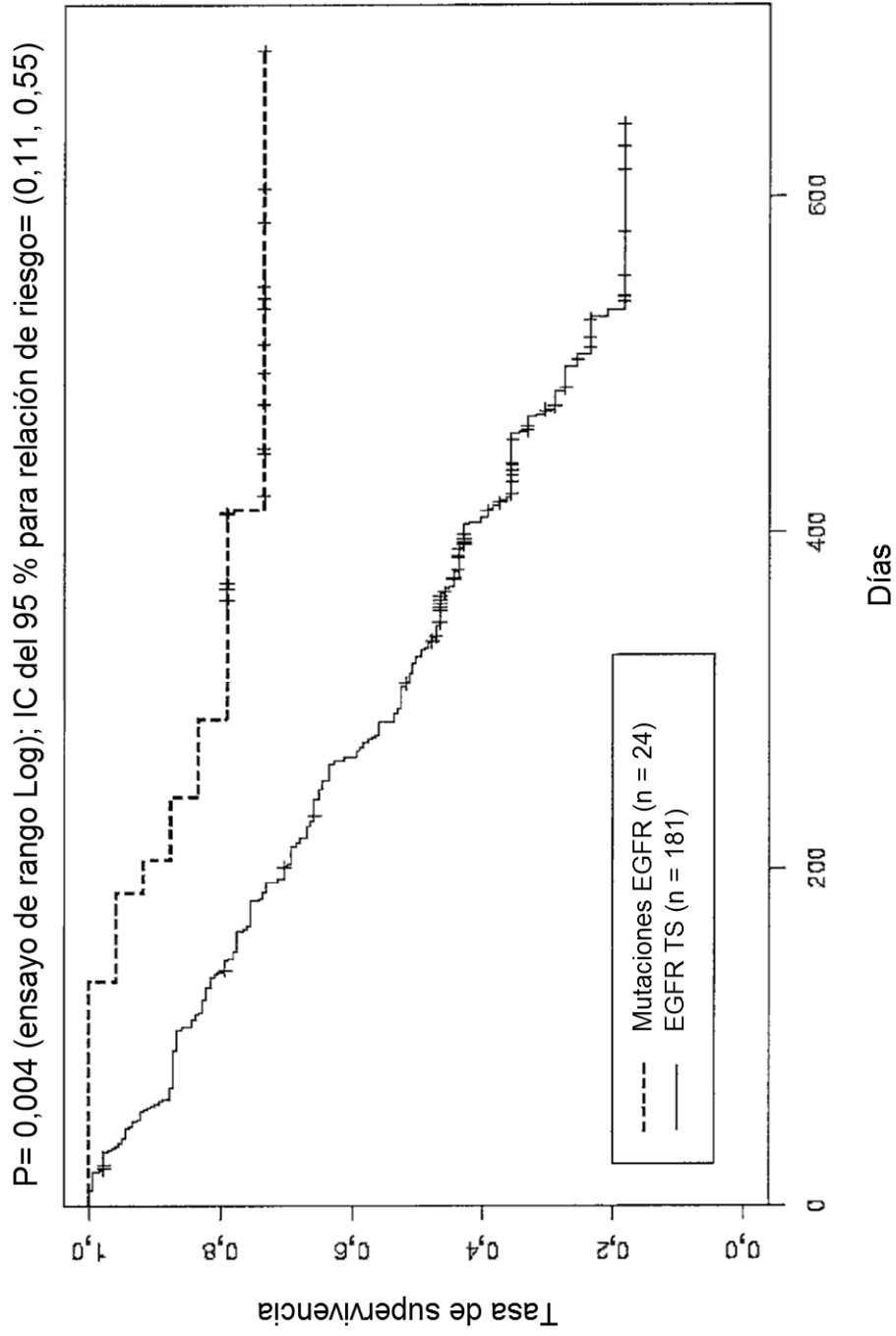


Figura 5

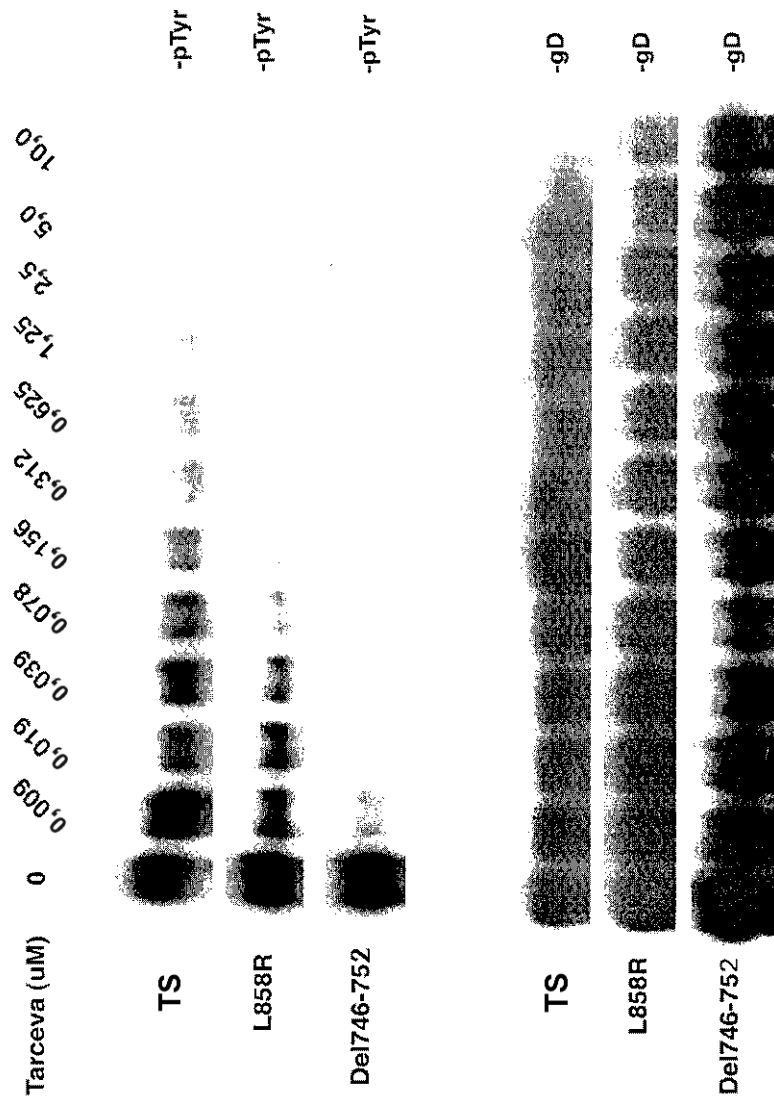


Figura 6

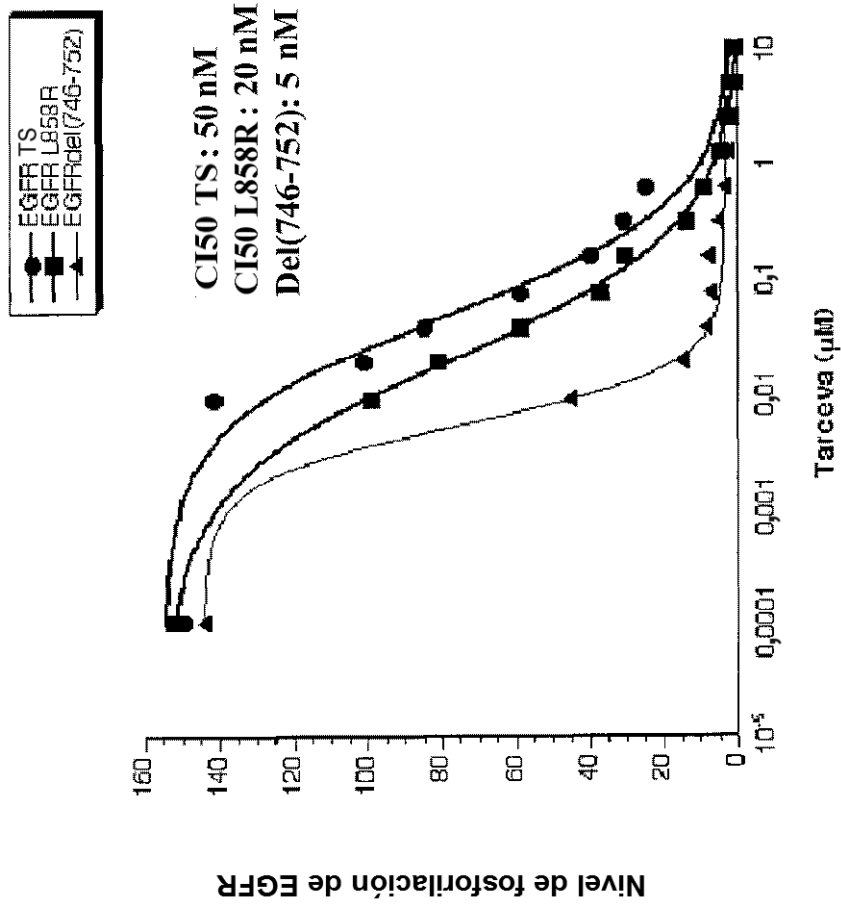


Figura 7

EXÓN 18

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

EXÓN 19

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

Figura 8

EXÓN 20

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

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

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

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

EXÓN 21

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

M10 (L858R) TTTGGGCGGGCCAAACTG {FGR^AKL}
 (SEC ID N°: 28) (SEC ID N°: 29)

M14 (L858P) TTTGGGCGGGCCAAACTG {FGP^AKL}
 (SEC ID N°: 30) (SEC ID N°: 31)

Figura 9