



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 066**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06743052 .0**
96 Fecha de presentación : **24.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1915460**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2008**

54 Título: **Método para la predicción de la respuesta a un tratamiento con un inhibidor de la dimerización de Her.**

30 Prioridad: **12.08.2005 EP 05017663**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.04.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Moecks, Joachim;**
Strauss, Andreas y
Zugmaier, Gerhard

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 356 066 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la predicción de la respuesta a un tratamiento con un inhibidor de la dimerización de Her.

5 **Campo de la invención**

La invención está relacionada con un método de predicción de la respuesta a un tratamiento con un inhibidor de la dimerización de HER en un paciente, lo que comprende los pasos de valorar una proteína marcadora codificada por el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa o una combinación de una proteína marcadora codificada por el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste en un factor de un factor de crecimiento epidérmico, un factor de crecimiento transformante alfa y un gen marcador HER2, en una muestra biológica del paciente, en la que la muestra biológica es suero sanguíneo, y predecir la respuesta al tratamiento con inhibidor de la dimerización de HER en el paciente mediante la evaluación de los resultados del primer paso. Se describen usos y métodos adicionales.

15 **Antecedentes de la invención**

La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (ErbB o HER) comprende cuatro miembros (HER1-4) que, a través de la activación de una cascada de señalización compleja, son importantes mediadores del crecimiento celular, la supervivencia y la diferenciación. Al menos 11 productos génicos diferentes de la superfamilia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) se unen a tres de estos receptores, EGFR (también llamado ErbB1 o HER1), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). Aunque no se ha identificado el ligando que se une y activa a HER2 (ErbB2 o neu), la teoría que prevalece es que HER2 es un coreceptor que actúa en conjunción con otros receptores HER para amplificar y en algunos casos iniciar la señalización receptor-ligando. La dimerización con el mismo tipo de receptor (homodimerización) o con otro miembro de la familia HER (heterodimerización) es esencial para su actividad. HER2 es la pareja de dimerización preferida por otros miembros de la familia HER. El papel de la familia HER en muchos tipos de tumores epiteliales está bien documentado y ha conducido al desarrollo racional de nuevos agentes contra el cáncer dirigidos específicamente a los receptores HER. El anticuerpo monoclonal (MAb) recombinante humanizado anti-HER2 trastuzumab es un estándar en el cuidado de pacientes con cáncer de mama metastásico (MBC) HER2-positivo. La sobreexpresión/amplificación de la proteína/gen HER2, que aparece en el 20-30% de los casos de cáncer de mama, es un prerrequisito para el tratamiento con trastuzumab.

El pertuzumab (OmnitargTM; anteriormente 2C4) es el primero de un nuevo tipo de agentes conocidos como inhibidores de la dimerización de HER (HDI). El pertuzumab se une a HER2 en su dominio de dimerización, inhibiendo así su capacidad de formar complejos diméricos de receptor activo y bloqueando así la cascada de señalización posterior que finalmente resulta en el crecimiento celular y la división. El pertuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante totalmente humanizado dirigido contra el dominio extracelular de HER2. La unión de pertuzumab a HER2 en células epiteliales humanas evita que HER2 forme complejos con otros miembros de la familia HER (lo que incluye EGFR, HER3 y HER4) y probablemente también la homodimerización de HER2. Mediante el bloqueo de la formación de complejos, el pertuzumab evita los efectos de estimulación del crecimiento y las señales de supervivencia celular activadas por los ligandos de HER1, HER3 y HER4 (por ejemplo EGF, TGF α , anfiregulina, y las heregulinas). Otros nombres del pertuzumab son 2C4 o OmnitargTM. El pertuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante totalmente humanizado basado en las secuencias marco de la IgG1(κ) humana. La estructura de pertuzumab consiste en dos cadenas pesadas (449 residuos) y dos cadenas ligeras (214 residuos). En comparación con el trastuzumab (HerceptinTM), el pertuzumab tiene 12 aminoácidos diferentes en la cadena ligera y 29 aminoácidos diferentes en la cadena pesada de la IgG1.

Derynck, R., *et al.*, describe la estructura precursora y la expresión del factor de crecimiento transformante alfa en *E. coli* que está secretada por muchos tumores humanos y que puede inducir la transformación reversible de las líneas celulares no transformadas.

WO 2004/092353 y WO 2004/091384 presentan investigaciones sobre que la formación de heterodímeros de Her2 con otros receptores debería estar ligada a la efectividad o funcionamiento del pertuzumab.

Zabrecky, J. R. *et al.*, J. Biol. Chem. 266 (1991) 1716-1720 describen que la liberación del dominio extracelular de Her2 puede tener implicaciones en la oncogénesis y su detección podría ser útil en el diagnóstico del cáncer. Colomer R. *et al.*, Clin. Cancer Res. 6 (2000) 2356-2362 describe el dominio extracelular de Her2 circulante y la resistencia a la quimioterapia en el cáncer de mama avanzado. El pronóstico y valor predictivo del dominio extracelular de Her2 se revisa en Hait, W. N. Clin. Cancer Res. 7 (2001) 2601-2604.

La patente US2004/106161 describe la identificación de tumores respondedores al tratamiento con anticuerpos anti-Her2 al detectar la presencia de un complejo de proteínas HER2/HER3 y/o HER2/HER1 o de la fosforilación de HER2 en una muestra de células tumorales. Los pacientes que padecen de un tumor que comprende heterodímeros de HER2/HER1 y/o HER2/HER3 y/o fosforilación de HER2 se tratan con anticuerpos anti-HER2, como rhuMAb 2C4.

La patente WO20005/047534 proporciona composiciones, métodos y usos para la predicción, diagnóstico, pronóstico, prevención y tratamiento de neoplasias malignas y cáncer de mama en particular. Se describen los genes que

se expresan de forma diferencial en el tejido mamario de pacientes con cáncer de mama versus los de la población normal.

5 La patente WO2004/091384 está dirigida a una clase de biomarcadores en muestras de pacientes que comprenden dímeros de receptores de membrana de superficie celular ErbB.

Panica, L., *et al.*, Int. J. Cancer 65 (1996) 51-56 describe la detección inmunohistoquímica diferencial del factor de crecimiento transformante alfa, anfiregulina y cripto en tejidos humanos normales y tejidos de cáncer de mama.

10 Resumen de la invención

Todavía existe la necesidad de proporcionar métodos adicionales para la determinación de la progresión de la enfermedad en un paciente con cáncer tratado con un inhibidor de la dimerización de HER.

15 Asimismo, en una realización de la invención, se proporciona un método para la predicción de la respuesta a un tratamiento con un inhibidor de la dimerización de HER en un paciente, lo que comprende los pasos de

a) valorar en una muestra biológica del paciente, en la que la muestra biológica es suero sanguíneo, el nivel de expresión de una

- 20 - proteína marcadora codificada por el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa o una
- combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores en los que la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores consiste en las proteínas marcadoras codificadas por
- 25 - el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2,
- el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico,
- 30 - el gen marcador de la anfiregulina y el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa,
- el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico y el gen marcador de HER2,
- 35 - el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico y el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa,
- el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2,
- 40 - el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2,
- 45 - el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2, y

b) predecir la respuesta al tratamiento con el inhibidor de la dimerización de HER en el paciente mediante la evaluación de los resultados del paso a).

55 En otra realización de la invención, se utiliza un anticuerpo que se une específicamente a la proteína marcadora del factor de crecimiento transformante alfa para predecir la respuesta al tratamiento con el anticuerpo 2C4 en un paciente.

Los artículos “un” y “una” se utilizan aquí en referencia a uno o más de uno (es decir a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. Como ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

60 El término “muestra biológica” significa generalmente cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, fluido corporal, línea celular, cultivo tisular, u otra fuente. Los fluidos corporales son por ejemplo linfa, suero, plasma, orina, semen, líquido sinovial y líquido espinal. Los métodos para la obtención de biopsias tisulares y los fluidos corporales de mamíferos son bien conocidos en la materia. Si el término “muestra” se utiliza solo, podría también significar que la muestra es una “muestra biológica”, es decir los términos se utilizan de forma intercambiable.

65 Los términos “respuesta a un tratamiento con un inhibidor de la dimerización de HER” o “respuesta de un paciente a un tratamiento con un inhibidor de la dimerización de HER” se refiere al beneficio clínico recibido por el paciente que padece de una enfermedad o condición (como el cáncer) a partir de o como resultado del tratamiento con el inhibidor de la dimerización de HER. Un beneficio clínico incluye una remisión completa, una remisión parcial, una

estabilización de la enfermedad (sin progresión), supervivencia sin progresión, supervivencia sin enfermedad, mejora en el tiempo de progresión (de la enfermedad), mejora en el tiempo hasta la muerte, o mejora en el tiempo global de supervivencia del paciente, a partir de o como resultado del tratamiento con el inhibidor de la dimerización de HER. Existen criterios para la determinación de una respuesta a la terapia y estos criterios permiten la comparación de la eficacia con tratamientos alternativos (Slapak y Kufe, Principles of Cancer Therapy, en Harrison's Principles of Internal Medicine, 13ª edición, eds. Isselbacher *et al.*, McGraw-Hill, Inc. 1994). Por ejemplo, una respuesta completa o remisión completa del cáncer es la desaparición de toda enfermedad maligna detectable. Una respuesta parcial o remisión parcial del cáncer puede ser por ejemplo, una reducción aproximada del 50 por ciento en el producto de los mayores diámetros perpendiculares de una o más lesiones o cuando no hay un aumento en el tamaño de ninguna lesión o la aparición de nuevas lesiones.

Tal como se utiliza en este documento, el término "progresión del cáncer" incluye y puede referirse a metástasis; una recurrencia del cáncer, o un aumento de al menos aproximadamente un 25 por ciento en el producto de los mayores diámetros perpendiculares de una lesión o la aparición de nuevas lesiones. La progresión del cáncer, preferiblemente cáncer de mama, está "inhibida" si la recurrencia o metástasis del cáncer se reduce, ralentiza, retrasa o evita.

El término "tiempo hasta la progresión/muerte (TTP)" es un sinónimo de "supervivencia libre de progresión (PFS)". Este describe un criterio de valoración clínico utilizado con frecuencia en los ensayos oncológicos. Aquí la medida para cada paciente es igual al tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento de un paciente en un ensayo (definido en el protocolo del ensayo) hasta la detección de una progresión del cáncer (definido en el protocolo del ensayo) o la aparición de cualquier fatalidad (lo que sea primero). Si finaliza el seguimiento del paciente (por ejemplo, al finalizar el estudio) tras un periodo *t*, y no se observa ningún evento, entonces este tiempo de observación *t*, se denomina "censurado".

El término "Tiempo hasta la muerte (TTD)" es un sinónimo de "Supervivencia global (OS)". Este describe un criterio de valoración clínico utilizado con frecuencia en los ensayos oncológicos. Aquí la medida para cada paciente es igual al tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento de un paciente en un ensayo (definido en el protocolo del ensayo) hasta la aparición de cualquier fatalidad. Si finaliza el seguimiento del paciente (por ejemplo, al finalizar el estudio) tras un periodo *t*, y no se observa ningún evento, entonces este tiempo de observación *t*, se denomina "censurado".

El término "covariado" posee el siguiente significado. Los criterios de valoración clínicos se consideran con frecuencia en modelos de regresión, en los que el criterio de valoración representa la variable dependiente y los biomarcadores representan las variables principales o diana independiente (regresores). Si se consideran variables adicionales a partir del conjunto de datos clínicos, estos se denominan covariados (clínicos). El término "covariado clínico" se utiliza en este documento para describir toda la información clínica sobre el paciente, que está en general disponible en la línea basal. Estos covariados clínicos comprenden información demográfica como el sexo, edad, etc., otra información anamnésica, enfermedades concomitantes, terapias concomitantes, resultados de exámenes físicos, parámetros de laboratorio obtenidos, propiedades conocidas del tumor diana, información que cuantifica el alcance de la neoplasia, puntuaciones de rendimiento clínico como ECOG o índice de Karnofsky, estadio de enfermedades clínicas, tiempo y resultado de pretratamientos e historia de la enfermedad así como toda información similar, que pueda estar asociada con el pronóstico clínico.

El término "análisis crudo o sin ajustar" se refiere al análisis de regresión, en el que sobre los biomarcadores considerados no se utilizan covariados clínicos adicionales en el modelo de regresión, ni como factores independientes ni como covariado estratificante.

El término "ajustado por covariados" se refiere al análisis de regresión, en el que sobre los biomarcadores considerados se utilizan covariados clínicos adicionales en el modelo de regresión, como factores independientes o como covariado estratificante.

El término "univariado" se refiere en este documento a los modelos de regresión o aproximaciones gráficas en las que como variable independiente sólo uno de los biomarcadores diana es parte del modelo. Estos modelos univariados pueden considerarse con y sin covariados clínicos adicionales.

El término "multivariado" se refiere en este documento a los modelos de regresión o aproximaciones gráficas en las que como variables independientes más de uno de los biomarcadores diana es parte del modelo. Estos modelos multivariados pueden considerarse con y sin covariados clínicos adicionales.

Los "nucleótidos" son "nucleósidos" que además incluyen un grupo fosfato covalentemente unido a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos "nucleósidos" que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido tanto a la matriz hidroxilo en 2', 3' o 5' del azúcar. Un "nucleótido" es la "unidad monomérica" de un "oligonucleótido", más generalmente denominado aquí "compuesto oligomérico", o "polinucleótido", más generalmente denominado "compuesto polimérico". Otra expresión general, asimismo, es ácido desoxiribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA). Como se usa aquí, el término "polinucleótido" es sinónimo de "ácido nucleico".

El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (DNA o RNA) producidos sintéticamente o biológicamente que, por diseño o selección, contienen secuencias nucleotídicas específicas que les permiten hibridar bajo astringencias

ES 2 356 066 T3

definidas predeterminadas específicamente (es decir, preferentemente) a “ácidos nucleicos”. Una “sonda” puede identificarse como una “sonda de captura” lo que significa que ésta “captura” el ácido nucleico de modo que pueda ser separado de materiales no deseados que puedan dificultar su detección. Una vez se consigue la separación, la detección del “ácido nucleico diana” capturado puede conseguirse utilizando un procedimiento adecuado. Las “sondas de captura” a menudo se encuentran ya unidas a una fase sólida. De acuerdo con la presente invención, el término hibridación bajo “condiciones astringentes” tiene el mismo significado que en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), parágrafo 1.101-1.104). Preferiblemente, una “hibridación astringente” es adecuada cuando una señal de hibridación aún es detectable tras lavar durante 1 h con 1xSSC y SDS 0.1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferiblemente a 62°C, y más preferiblemente a 68°C, y más preferiblemente durante 1 hora con 0,2xSSC y SDS 0.1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferiblemente a 62°C, y aun más preferiblemente a 68°C. La composición del tampón SSC se describe en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

Un “polinucleótido transcrito” es un polinucleótido (por ejemplo un RNA, un cDNA, o un análogo de un RNA o cDNA) que es complementario u homólogo con todo o una porción de un RNA maduro producido por transcripción de un gen, como el gen marcador de la invención, y el procesado normal post-transcripcional (por ejemplo corte y empalme), si ocurre, del transcrito. El término “cDNA” es una abreviatura de DNA complementario, la copia de DNA de cadena sencilla o doble de un mRNA. El término “mRNA” es una abreviatura del RNA que sirve como molde para la síntesis proteica.

El término “gen marcador” pretende incluir un gen que es útil de acuerdo con esta invención para la determinación de la progresión del cáncer en un paciente, particularmente en un paciente con cáncer de mama. Podría llamarse también gen marcador de cáncer, preferiblemente cáncer de mama. El término “polinucleótido marcador” se pretende que incluya un transcrito de nucleótidos (hnRNA o mRNA) codificado por un gen marcador de acuerdo con la invención, o cDNA derivado del transcrito de nucleótidos, o un segmento de dicho transcrito o cDNA.

El término “proteína marcadora” o “polipéptido marcador” pretende incluir una proteína o polipéptido codificado por un gen marcador de acuerdo con la invención, o un polipéptido o fragmento de proteína que comprende dicha proteína marcadora.

El término “producto génico” se pretende que incluya un marcador polinucleotídico y una proteína marcadora codificada por el gen mencionado.

La expresión de un gen marcador difiere “significativamente” del nivel de expresión del gen marcador en una muestra de referencia si el nivel de expresión del gen marcador en una muestra del paciente difiere del nivel en una muestra del sujeto de referencia en una cantidad mayor que el error estándar del ensayo utilizado para valorar la expresión, y preferiblemente es de al menos un 10%, y más preferiblemente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500% o 1.000% de esa cantidad. Alternativamente, la expresión del gen marcador en el paciente puede considerarse “significativamente” inferior que el nivel de expresión en un sujeto control si el nivel de expresión en una muestra del paciente es inferior al nivel en una muestra del sujeto control en una cantidad superior al error estándar del ensayo utilizado para valorar la expresión, y preferiblemente es de al menos un 10%, y más preferiblemente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500% o 1.000% de esa cantidad.

Un polinucleótido marcador o una proteína marcadora “corresponden a” otro polinucleótido marcador o proteína marcadora si está relacionado con éstos, particularmente preferido es que sea idéntico a éstos.

El término “nivel de expresión” generalmente se refiere a la cantidad de un polinucleótido o un producto de aminoácidos o proteína en la muestra. “Expresión” generalmente se refiere al proceso por el cual la información codificada por un gen se convierte en las estructuras presentes y operativas en la célula, asimismo de acuerdo con la invención, el término “expresión” de un gen (marcador) incluye la transcripción en un polinucleótido, la traducción en una proteína y además la modificación post-traducciona de la proteína. Los fragmentos del polinucleótido transcrito, la proteína traducida o la proteína modificada post-traduccionalmente pueden también referirse como expresados si se originan por ejemplo de un transcrito generado por corte y empalme alternativo, un transcrito degradado o procesado post-traducciona de la proteína, por ejemplo mediante proteólisis. Como se usa aquí, los “genes expresados” incluyen aquellos que son transcritos a un polinucleótido como mRNA y luego traducidos a una proteína. Este término puede también incluir los genes expresados que son transcritos a RNA pero no traducidos a una proteína (por ejemplo, RNA de transferencia y ribosomal). Los términos “sobreexpresión” e “infraexpresión” se refieren a una desviación hacia arriba y hacia abajo respectivamente en los niveles de expresión comparado con el nivel de expresión basal en una muestra utilizada como control. La “sobreexpresión” es por lo tanto también “expresión aumentada” e “infraexpresión” es “expresión reducida”.

El término “anfíregulina” está relacionado con un gen que codifica una proteína y con la propia proteína que es un miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico. Es un factor de crecimiento autocrino así como un mitógeno para los astrocitos, las células de Schwann, y los fibroblastos. Está relacionado con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa). Esta proteína interacciona con el receptor del EGF/TGF-alfa para promover el crecimiento de las células epiteliales normales e inhibir el crecimiento de ciertas líneas celulares de carcinoma agresivo. De acuerdo con la invención, la secuencia de aminoácidos de anfíregulina es

ES 2 356 066 T3

la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 1. De acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico del cDNA de la “anfiregulina” es la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 5 al que se puede acceder en GenBank con el número de acceso NM_001657.

5 El término “factor de crecimiento transformante alfa” está relacionado con un gen que codifica una proteína y con la propia proteína, que es un miembro de la familia de los factores de crecimiento transformantes (TGFs). Éstos son polipéptidos biológicamente activos que confieren de forma reversible el fenotipo transformado a células en cultivo. El “factor de crecimiento transformante alfa” muestra alrededor de un 40% de homología de secuencia con el factor de crecimiento epidérmico y compite con el EGF por la unión al receptor de EGF, estimulando su fosforilación y produciendo una respuesta mitogénica. De acuerdo con la invención, la secuencia de aminoácidos del “factor de crecimiento transformante alfa” es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 3. De acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico del cDNA del “factor de crecimiento transformante alfa” es la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 7 al que se puede acceder en GenBank con el número de acceso NM 003236.

15 El término “factor de crecimiento epidérmico” está relacionado con un gen que codifica una proteína y con la propia proteína que es un miembro de la familia de los factores de crecimiento. El “factor de crecimiento epidérmico (EGF)” tiene un importante efecto sobre la diferenciación de células específicas *in vivo* y es un potente factor mitogénico para una variedad de células en cultivo tanto de origen ectodérmico como mesodérmico. Se cree que el precursor del EGF existe como una molécula unida a membrana que es escindida proteolíticamente para generar la hormona peptídica de 53 aminoácidos que estimula que las células se dividan. De acuerdo con la invención, la secuencia de aminoácidos del “factor de crecimiento epidérmico” es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 2. De acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico del cDNA del “factor de crecimiento epidérmico (EGF)” es la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 6 al que se puede acceder en GenBank con el número de acceso NM_001963. El “receptor del factor de crecimiento epidérmico” abreviado como EGFR, una glicoproteína de 170-kD, está formada por un dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembrana hidrofóbico, y una región intracelular C-terminal que contiene el dominio quinasa. El mRNA tiene diferentes variantes traducidas a diferentes proteínas receptor. De acuerdo con la invención, la secuencia de aminoácidos del “receptor del factor de crecimiento epidérmico” es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 11 (tránsito variante 1; número de acceso de GenBank NM_005228), Id. de Sec. Núm. 12 (tránsito variante 2; número de acceso de GenBank NM_201282), Id. de Sec. Núm. 13 (tránsito variante 3; número de acceso de GenBank NM_201283), o Id. de Sec. Núm. 14 (tránsito variante 4; número de acceso de GenBank NM_201284). El EGFR, codificado por gen *erbB1*, ha sido implicado con una relación causal en las neoplasias humanas. En particular, se ha observado la expresión aumentada de EGFR en el cáncer de mama, vejiga urinaria, pulmón, cabeza, cuello y estómago así como en glioblastomas. La dimerización inducida por ligando del EGFR activa el dominio RTK intrínseco (un dominio de homología a Src 1, SH1), lo que resulta en la autofosforilación en seis residuos tirosina específicos del EGFR en la cola no catalítica del dominio citoplasmático. Los efectos celulares de la activación del EGFR en una célula cancerosa incluyen la proliferación aumentada, promoción de la motilidad celular, adhesión, invasión, angiogénesis, y aumento de la supervivencia celular mediante la inhibición de la apoptosis. El EGFR activado induce la proliferación de las células tumorales a través de la estimulación de la cascada de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK).

35 Los términos “neu humano”, “c-erbB-2”, “erbB2”, “erbB-2”, “HER-2/neu”, “Her2” y “HER-2” se utilizan aquí de forma intercambiable. El término “Her2” se relaciona con un gen que codifica una proteína y con la propia proteína, que es un miembro de la familia de receptores tirosina quinasa de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Esta proteína no tiene un dominio de unión a ligando por sí misma y por lo tanto no puede unir factores de crecimiento. Sin embargo, se une fuertemente a otros miembros de la familia del receptor de EGF unidos a ligando para formar un heterodímero, estabilizando la unión al ligando y aumentando la activación mediada por la quinasa de las vías de señalización posteriores, como las que involucran a la proteína quinasa activada por mitógenos y a la fosfatidilinositol-3 quinasa. Se han descrito variaciones alélicas en las posiciones aminoácidas 654 y 655 de la isoforma a (posiciones 624 y 625 de la isoforma b), siendo el preferido el alelo más común, Ile654/Ile655 de acuerdo con la invención. La amplificación y/o sobreexpresión de este gen se ha descrito en numerosas neoplasias, lo que incluye los tumores de mama y ováricos. El corte y empalme alternativo resulta en muchos transcritos variantes adicionales, codificando algunos diferentes isoformas y otros aún no se han caracterizado completamente. De acuerdo con la invención, la secuencia de aminoácidos de Her2 es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 4. De acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico del cDNA de “Her2” es la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 8 al que se puede acceder en GenBank con el número de acceso NM 004448.2.

60 El “dominio extracelular de Her2” o “dominio de liberación extracelular de Her2” es una glicoproteína de entre 97 y 115 kDa que corresponde sustancialmente al dominio extracelular del producto génico Her2 humano. Puede estar referido como p105 (Zabrecky J. R. *et al.*, J. Biol. Chem. 266 (1991) 1716-1720; US 5.401.638; US 5.604.107). La cuantificación y detección del dominio extracelular de Her2 se describe en las patentes estadounidenses US 5.401.638 y US 5.604.107.

65 El término “Her3” se aplica a otro miembro de los receptores tirosina quinasa de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta proteína unida a membrana no tiene un dominio activo quinasa. La proteína puede unir ligandos pero no transmitir una señal en la célula. Ésta forma heterodímeros con otros miembros de la

ES 2 356 066 T3

familia del receptor de EGF que tienen actividad quinasa, lo que da lugar a la proliferación o diferenciación celular. La amplificación de este gen y/o la sobreexpresión de esta proteína se encuentra en numerosas neoplasias. De acuerdo con la invención, la secuencia de aminoácidos del cDNA de "Her3" es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 9 al que se puede acceder en GenBank al traducir la secuencia de ácido nucleico de Her3 con el número de acceso NM_001005915. De acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico del cDNA de "Her3" es la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el Id. de Sec. Núm. 10 al que se puede acceder en GenBank con el número de acceso NM_001005915.

El término "anticuerpo" se utiliza aquí en su sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales intactos, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) formados de al menos dos anticuerpos intactos, y los fragmentos de anticuerpo, siempre que tengan la actividad biológica deseada.

El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos con la excepción de posibles mutaciones que aparecen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que pueden sintetizarse de forma no contaminada por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, su obtención a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse mediante el método del hibridoma descrito inicialmente por Kohler, G. *et al.*, Nature 256 (1975) 495-497, o pueden obtenerse mediante métodos de DNA recombinante (véase, por ejemplo U. S. 4.816.567). Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto.

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés de acuerdo con la invención es aquel capaz de unirse al antígeno con suficiente afinidad para que el anticuerpo sea útil en la detección de la presencia del antígeno. El anticuerpo de acuerdo con la invención es aquel que se une a Her2 humano y no reacciona de forma cruzada (significativamente) con otras proteínas. En estas realizaciones, la unión del anticuerpo a otras proteínas será inferior al 10% como se determina mediante análisis de selección celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

La dimerización - el emparejamiento de receptores - es esencial para la actividad de señalización de todos los receptores HER. De acuerdo con la invención, el término "inhibidor de la dimerización de Her" o preferiblemente "inhibidor de la heterodimerización de Her2" se refiere a un agente terapéutico que se une a Her2 e inhibe la heterodimerización de Her2. Son preferiblemente anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, más preferiblemente anticuerpos humanizados que se unen a Her2 e inhiben la heterodimerización de Her2. Ejemplos de anticuerpos que se unen a HER2 incluyen el 4D5, 7C2, 7F3 o 2C4 así como las variantes humanizadas de los mismos, incluyendo el huMAB4D5-1, huMAB4D5-2, huMAB4D5-3, huMAB4D5-4, huMAB4D5-5, huMAB4D5-6, huMAB4D5-7 y huMAB4D5-8 como se describe en la Tabla 3 de la patente U.S. 5.821.337; y los números de mutante del 2C4 humanizado 560, 561, 562, 568, 569, 570, 571, 574, o 56869 como se describe en la WO01/00245. El 7C2 y 7F3, y las variantes humanizadas de los mismos se describen en la WO98/17797. Este término puede no aplicarse a los anticuerpos monoclonales como el trastuzumab vendido bajo el nombre Herceptin™ ya que el mecanismo de acción es diferente y este anticuerpo no inhibe la dimerización de Her.

Es preferido a lo largo de la solicitud el "anticuerpo 2C4", en particular la variante humanizada del mismo (WO 01/00245; producida por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA bajo el nombre ATCC HB-12697), que se une a una región en el dominio extracelular de Her2 (por ejemplo, uno a más residuos cualquiera de la región entre alrededor del residuo 22 a alrededor del residuo 584 de Her2, ambos incluidos). El "epítomo 2C4" es la región en el dominio extracelular de ErbB2 a la cual se une el anticuerpo 2C4. La expresión "anticuerpo monoclonal 2C4" se refiere a un anticuerpo que tiene los residuos de unión al antígeno del anticuerpo 2C4 murino, o uno derivado del mismo, de los Ejemplos en la WO 01/00245. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 2C4 puede ser el anticuerpo monoclonal 2C4 murino o una variante del mismo, como el anticuerpo 2C4 humanizado, que posea los residuos aminoácidos de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal 2C4 murino. Ejemplos de anticuerpos 2C4 humanizados se proporcionan en el Ejemplo 3 de la WO 01/00245. A menos que se indique de otro modo, cuando la expresión "rhuMAB 2C4" se usa aquí se refiere a un anticuerpo que comprende las secuencias variable ligera (VL) y variable pesada (VH) de Id. de Sec. Núm. 3 y 4 de la WO 01/00245, respectivamente, fusionadas con las secuencias de la región constante ligera y pesada de la IgG1 humana (alotipo no A) opcionalmente expresada en células de ovario de hámster chino (CHO). Las realizaciones preferidas de la WO 01/00245 son también preferidas aquí. El anticuerpo 2C4 humanizado se llama también pertuzumab (Omnitarg™).

Un "equipo" es cualquier manufactura (por ejemplo paquete o contenedor) que comprenda al menos un reactivo, por ejemplo una sonda, para la detección específica de un gen marcador o proteína de la invención. La manufactura es preferiblemente promovida, distribuida, o vendida como una unidad para realizar los métodos de la presente invención.

Los verbos "determinar" y "valorar" pueden tener el mismo significado y se utilizan de forma intercambiable a lo largo de la solicitud.

Descripción detallada de la invención

Las técnicas convencionales de biología molecular y química de ácidos nucleicos, que forman parte de la experiencia en la materia, se explican en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, J., *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Gait, M. J., (ed.), *Oligonucleotide synthesis - a practical approach*, IRL Press Limited, 1984; Hames, B. D., y Higgins, S. J., (eds.), *Nucleic acid hybridization - a practical approach*, IRL Press Limited, 1985; y una serie, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., todos ellos incorporados aquí como referencia. Todas las patentes, solicitudes de patente, y publicaciones mencionadas aquí, tanto anteriormente como a continuación, se incorporan aquí como referencia.

a) valorar en una muestra biológica del paciente, en la que la muestra biológica es suero sanguíneo, el nivel de expresión de una

- proteína marcadora codificada por el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa o una
- combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores en los que la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores consiste en las proteínas marcadoras codificadas por
- el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2,
- el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico,
- el gen marcador de la anfiregulina y el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa,
- el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico y el gen marcador de HER2,
- el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico y el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa,
- el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2,
- el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de Her2,
- el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2, y

b) predecir la respuesta al tratamiento con el inhibidor de la dimerización de HER en el paciente mediante la evaluación de los resultados del paso a).

Preferiblemente, en el método de acuerdo con la invención, el paso a) de valoración de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores comprende

a1) valorar el nivel de expresión de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores,

a2) determinar si el nivel de expresión valorado en el paso a1) está por encima o por debajo del valor umbral.

El valor umbral es preferiblemente un valor expresado en masa/volumen para el suero sanguíneo. Puede medirse mediante métodos conocidos para el experto versado en la materia y también descritos en esta invención.

En una realización preferible de la invención, si el valor está por encima o por debajo del valor umbral, puede determinarse la respuesta al tratamiento. Respecto al uso de una única proteína marcadora codificada por el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa de acuerdo con la invención, la situación es la que sigue para pacientes con cáncer de mama metastásico. Esta manera depende, no obstante, de la indicación pero puede determinarse en base a la descripción de esta invención. Respecto al gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa solo, son favorables los niveles bajos de expresión son favorables para la supervivencia libre de progresión (tiempo hasta la muerte o progresión) y supervivencia global (tiempo hasta la muerte) cuando el tratamiento con un inhibidor de la dimerización de HER se considera para un paciente con cáncer de mama metastásico con niveles de expresión bajos para Her2, es decir, un nivel bajo de expresión del gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa predice una buena respuesta en estos pacientes a un tratamiento con un inhibidor de la dimerización de HER (véase Fig. 7). Éste es el caso tanto para los covariados clínicos crudos como ajustados. Por lo tanto, es preferible que el nivel de ex-

ES 2 356 066 T3

presión valorado en el paso a1) del gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa esté por debajo del valor umbral para predecir una buena respuesta al tratamiento con un inhibidor de la dimerización de HER en pacientes con cáncer de mama metastásico con niveles de expresión bajos para Her2.

5 Ya que las proteínas marcadoras codificadas por los genes marcadores, en particular en suero, pueden utilizarse en modelos de predicción de marcador múltiple que incluyen potencialmente otros covariados clínicos, en dichos modelos no puede determinarse de forma simple la dirección de un efecto beneficiosos de una única proteína marcadora codificada por el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa, y puede contradecir la dirección encontrada en los análisis univariados, es decir, la situación que se ha descrito para el uso de una única proteína marcadora
10 codificada por el gen marcador.

Más preferiblemente, en el método de acuerdo con la invención, el valor umbral se determina antes del paso a1) del método de la invención mediante

15 a1) valorar el nivel de expresión de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por los genes marcadores en una pluralidad de muestras biológicas, en el que las muestras biológicas son muestras de suero sanguíneo, de pacientes antes del tratamiento con el inhibidor de la dimerización de HER,

20 2) correlacionar la respuesta de los pacientes tratados con el inhibidor de la dimerización de HER con el nivel de expresión de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores determinados en el paso a) determinando de ese modo el valor umbral.

25 El valor umbral es preferiblemente un valor expresado en masa/volumen para el suero sanguíneo.

La presente invención también considera las mutaciones o variantes de proteínas marcadoras codificadas por los genes marcadores de acuerdo con la presente invención y que se utilizan en los métodos de acuerdo con la invención. En estos mutantes o variantes, la secuencia nativa del gen marcador se cambia mediante sustituciones, deleciones o
30 inserciones. La "secuencia nativa" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico que es idéntica a la forma tipo salvaje o nativa de un gen marcador o proteína.

La presente invención también considera los mutantes o variantes de las proteínas de acuerdo con la presente invención y que se utilizan en los métodos de acuerdo con la invención. Una "secuencia de aminoácidos mutante",
35 "proteína mutante" o "polipéptido mutante" se refiere a un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia nativa o está codificada por una secuencia de nucleótidos que se ha alterado intencionadamente a partir de la secuencia nativa. Una "proteína mutante", "proteína variante" o "mutéina" significa una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mutante e incluye los polipéptidos que difieren de la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de acuerdo con la invención debido a deleciones y sustituciones de aminoácidos, o ambas.
40

La presente invención también considera un método para la predicción de la respuesta a un tratamiento con una combinación de un inhibidor de la dimerización de HER y otra sustancia o agente como un agente quimioterapéutico o un anticuerpo terapéutico utilizado para el tratamiento del cáncer. El agente quimioterapéutico puede ser por ejemplo gemcitabina (Gemzar®; nomenclatura química: 2',2'-difluorodeoxicidina (dFdC)), carboplatino
45 (diamina-(ciclobutano-1,1-dicarboxilato(2-)-O,O')-platino), o paclitaxel (Taxol®, nomenclatura química: éster de β -(benzoilamino)- α -hidroxi-6,12b-bis(acetiloxi)-12-(benzoiloxi)-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11, 12,12a,12b-dodecahidro-4,11-dihidroxi-4a,8,13,13-tetrametil-5-oxo-7,11-metano-1H-ciclododeca(3,4)benz(1,2-b)oxet-9-ilo, (ácido 2aR-(2a- α ,4- β ,4a- β ,6- β ,9- α -(α -R*, β -S*)),11- α ,12- α ,12a- α ,2b- α))-bencenpropanoico).

50 En otra realización preferible de la invención, el inhibidor de la dimerización de HER inhibe la heterodimerización de HER2 con EGFR o HER3 o Her4. Preferiblemente, el inhibidor de la dimerización de HER es un anticuerpo, preferiblemente el anticuerpo 2C4. A lo largo de esta solicitud es preferido el "anticuerpo 2C4", en particular la variante humanizada del mismo (WO 01/00245; producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection, Manassass, VA, USA bajo el nombre ATCC HB-12697), que se une a una región del dominio
55 extracelular de Her2 (por ejemplo, uno o más residuos cualquiera de la región de alrededor del residuo 22 a alrededor del residuo 584 de Her2, ambos incluidos). Ejemplos de anticuerpos 2C4 humanizados se proporcionan en el Ejemplo 3 de la WO 01/00245. El anticuerpo 2C4 humanizado también se denomina Omnitarg™ o pertuzumab.

60 En otra realización preferible de la invención, el paciente es un paciente con cáncer, preferiblemente un paciente con cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón o cáncer de próstata. El paciente con cáncer de mama es preferiblemente un paciente con cáncer de mama metastásico o un paciente con una baja expresión de HER2 o un paciente con cáncer de mama metastásico o un paciente con cáncer de mama con una alta expresión de HER2 o un paciente con cáncer de mama metastásico. El paciente con cáncer de ovario es preferiblemente un paciente con cáncer de ovario metastásico. El paciente con cáncer de pulmón es preferiblemente un paciente con cáncer de pulmón de
65 células no pequeñas (NSCLC).

En una realización preferible de la invención, el nivel de expresión de un gen marcador o la combinación de genes marcadores en la muestra se valora mediante la detección del nivel de expresión de una proteína marcadora

ES 2 356 066 T3

o un fragmento de la misma o una combinación de proteínas marcadoras o fragmentos de las mismas codificadas por el gen marcador o la combinación de genes marcadores. Preferiblemente, el nivel de expresión de la proteína marcadora o el fragmento de la misma o la combinación de proteínas marcadoras o los fragmentos de las mismas se detectan utilizando un reactivo que se une específicamente a la proteína marcadora o el fragmento de la misma o la combinación de proteínas marcadoras o los fragmentos de las mismas. Preferiblemente, el reactivo se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o un derivado de un anticuerpo.

Hay muchos tipos diferentes de inmunoensayos que pueden utilizarse en el método de la presente invención, por ejemplo el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), ensayo inmunosorbente fluorescente (FIA), ensayo inmunosorbente ligado a químicos (CLIA), radioinmunoensayo (RIA), y inmunoblotting. Para una revisión de los diferentes inmunoensayos que pueden utilizarse, véase: Lottspeich y Zorbas (eds.), Bioanalytik, 1ª edición 1998, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín, Alemania. Asimismo, en otra realización preferible de la invención, el nivel de expresión se determina utilizando un método seleccionado de entre el grupo que consiste en proteómica, citometría de flujo, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, ensayo inmunosorbente ligado a enzima, ensayo inmunosorbente ligado a enzima multicanal, y variaciones de estos métodos. Asimismo, más preferiblemente, el nivel de expresión se determina utilizando un método seleccionado de entre el grupo que consiste en proteómica, citometría de flujo, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, ensayo inmunosorbente ligado a enzima, ensayo inmunosorbente ligado a enzima multicanal, y variaciones de estos métodos.

En otra realización preferible de la invención, el fragmento de la proteína marcadora es el dominio extracelular de la proteína marcadora HER2. Preferiblemente, el dominio extracelular de la proteína marcadora HER2 tiene un peso molecular de aproximadamente 105.000 Dalton. “Dalton” es una unidad de masa que es igual al peso de un átomo de hidrógeno, o 1.657×10^{-24} gramos.

En otra realización preferible de la invención

- la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora de la anfiregulina es la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. Núm. 1,

- la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora del factor de crecimiento epidérmico es la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. Núm. 2,

- la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora del factor de crecimiento transformante alfa es la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. Núm. 3, o

- la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora HER2 es la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. Núm. 4.

En otra realización preferible de la invención, el valor umbral en suero sanguíneo de

- la proteína marcadora del factor de crecimiento transformante alfa está entre 2,0 y 10,0, preferiblemente entre 2,0 y 5,0 pg/ml, más preferiblemente alrededor de 3,5 pg/ml,

- la proteína marcadora del factor de crecimiento epidérmico está entre 100 y 250 pg/ml, preferiblemente alrededor de 150 pg/ml, o

- la proteína marcadora de la anfiregulina está entre 6 y 15 pg/ml, preferiblemente alrededor de 12 pg/ml.

En otra realización preferible de la invención, el valor umbral en suero sanguíneo del dominio extracelular de la proteína marcadora Her2 está entre 12 y 22 ng/ml, preferiblemente alrededor de 18 ng/ml.

La secuencia de ácido nucleico del polinucleótido marcador de la anfiregulina es la secuencia de ácido nucleico Id. de Sec. N°: 5,

- la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido marcador del factor de crecimiento epidérmico es la secuencia de ácido nucleico Id. de Sec. N°: 6,

- la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido marcador del factor de crecimiento transformante alfa es la secuencia de ácido nucleico Id. de Sec. N°: 7, o

- la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido marcador de HER2 es la secuencia de ácido nucleico Id. de Sec. N°: 8.

En otra realización de la invención, un anticuerpo que se une a la proteína marcadora del factor de crecimiento transformante alfa se utiliza para predecir la respuesta al tratamiento con la expresión del gen marcador difiere “significativamente” del nivel de expresión del gen marcador en una muestra de referencia si el nivel de expresión del

ES 2 356 066 T3

gen marcador en una muestra del paciente difiere del nivel en una muestra del paciente de referencia por una cantidad superior al error estándar del ensayo utilizado para valorar la expresión, y preferiblemente al menos un 10%, y más preferiblemente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500% o 1000% de la cantidad. Alternativamente, la expresión del gen marcador en el paciente puede considerarse “significativamente” inferior al nivel de expresión en un sujeto de referencia si el nivel de expresión en una muestra de paciente es inferior al nivel en una muestra a partir de un sujeto de referencia por una cantidad superior al error estándar del ensayo utilizado para valorar la expresión, y preferiblemente al menos un 10%, y más preferiblemente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500% o 1000% de esa cantidad. La diferencia del nivel de expresión será de hasta un 10.000 o 50.000%. La diferencia del nivel de expresión está preferiblemente entre un 10% hasta un 10.000%, más preferiblemente entre un 25% y 10.000%, 50% a 10.000%, 100% a 10.000%, aún más preferiblemente entre un 25% y 5.000%, 50% y 5.000%, 100% y 5.000%.

En otra realización de la invención, se proporciona un método de selección de una composición para la inhibición de la progresión de la enfermedad en un paciente, comprendiendo este método:

a) la exposición separada de alícuotas de una muestra biológica de un paciente con cáncer en presencia de una pluralidad de composiciones de prueba;

b) la comparación del nivel de expresión de un gen marcador o una combinación de genes marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste en el gen marcador de la anfiregulina, del factor de crecimiento epidérmico, del factor de crecimiento transformante alfa y de HER2 en las alícuotas de la muestra biológica puesta en contacto con las composiciones de prueba y el nivel de expresión de un gen marcador o una combinación de genes marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste en el gen marcador de la anfiregulina, del factor de crecimiento epidérmico, del factor de crecimiento transformante alfa y de HER2 en una alícuota de la muestra biológica que no se ha puesto en contacto con las composiciones de prueba,

c) la selección de una de las composiciones de prueba que altera el nivel de expresión del gen marcador o la combinación de genes marcadores en la alícuota que contiene esta composición de prueba, en relación con la alícuota que no se ha puesto en contacto con la composición de prueba en la que una diferencia significativa o de al menos un 10% entre el nivel de expresión del gen marcador o la combinación de genes marcadores en la alícuota de la muestra biológica puesta en contacto con la composición de prueba y el nivel de expresión del gen marcador correspondiente o la combinación de genes marcadores en la alícuota de la muestra biológica que no se ha puesto en contacto con la composición de prueba, es una indicación para la selección de la composición de prueba. La enfermedad es preferiblemente cáncer y el paciente es preferiblemente un paciente con cáncer como se ha descrito anteriormente.

En otra realización de la invención, se proporciona un método de selección de una composición para la inhibición de la progresión de la enfermedad en un paciente, comprendiendo este método:

a) la exposición separada de alícuotas de una muestra biológica de un paciente con cáncer en presencia de una pluralidad de composiciones de prueba;

b) la comparación del nivel de expresión de

- un gen marcador o una combinación de genes marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste en el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico, del factor de crecimiento transformante alfa y de HER2, o de
- una combinación de genes marcadores que comprende un gen marcador de la anfiregulina y un gen marcador seleccionados de entre el grupo del factor de crecimiento epidérmico, del factor de crecimiento transformante alfa y de HER2,

en las alícuotas de la muestra biológica puesta en contacto con las composiciones de prueba y el nivel de expresión de

- un gen marcador o una combinación de genes marcadores seleccionado de entre el grupo que consiste en el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico, del factor de crecimiento transformante alfa y de HER2, o una
- combinación de genes marcadores que comprende un gen marcador de la anfiregulina y un gen marcador seleccionado de entre el grupo del factor de crecimiento epidérmico, del factor de crecimiento transformante alfa y de HER2,

en una alícuota de la muestra biológica que no se ha puesto en contacto con las composiciones de prueba,

c) la selección de una de las composiciones de prueba que altera el nivel de expresión del gen marcador o la combinación de genes marcadores en la alícuota que contiene esta composición de prueba, en relación con la alícuota que no se ha puesto en contacto con la composición de prueba en la que una diferencia significativa o de al menos un 10%

entre el nivel de expresión del gen marcador o la combinación de genes marcadores en la alícuota de la muestra biológica puesta en contacto con la composición de prueba y el nivel de expresión del gen marcador correspondiente o la combinación de genes marcadores en la alícuota de la muestra biológica que no se ha puesto en contacto con la composición de prueba, es una indicación para la selección de la composición de prueba. La enfermedad es preferiblemente 5 cáncer y el paciente es preferiblemente un paciente con cáncer como se ha descrito anteriormente.

La expresión de un gen marcador difiere “significativamente” del nivel de expresión del gen marcador en una muestra de referencia si el nivel de expresión del gen marcador en una muestra del paciente difiere del nivel en 10 una muestra del sujeto de referencia en una cantidad superior al error estándar del ensayo utilizado para valorar la expresión, y preferiblemente en al menos un 10%, y más preferiblemente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500% o 1.000% de esa cantidad. Alternativamente, la expresión del gen marcador en el paciente puede considerarse “significativamente” inferior al nivel de expresión en un sujeto de referencia si el nivel 15 de expresión en una muestra del paciente es inferior al nivel en una muestra del sujeto de referencia en una cantidad superior al error estándar del ensayo utilizado para valorar la expresión, y preferiblemente en al menos un 10%, más preferiblemente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500% o 1.000% de esta cantidad. La diferencia del nivel de expresión puede ser de hasta 10.000 o 50.000%. La diferencia del nivel de expresión está preferiblemente entre el 10% y 10.000%, más preferiblemente del 25% al 10.000%, del 50% al 10.000%, del 100% al 10.000%, y aun más preferiblemente del 25% al 5.000%, del 50% al 5.000%, del 100% al 5.000%. 20

Descripción de las figuras

Figura 1: Gráfico de dispersión de la transformación logarítmica de TGF-alfa frente al beneficio clínico categori- 25 zado.

Figura 2: Gráfico de dispersión de la transformación logarítmica de la Anfiregulina frente al beneficio clínico categorizado.

Figura 3: Beneficio clínico ordinal de TGF-alfa. 30

Figura 4: Beneficio clínico ordinal de la anfiregulina.

Figura 5: Beneficio clínico ordinal de EGF.

Figura 6: Beneficio clínico ordinal de HER2-ECD. 35

Figura 7: Revisión exploratoria de los valores de los puntos de corte y rango-log de p de TTP y TTD para Anfire- 40 gulina, EGF, TGF-alfa y HER2-ECD.

Figura 8: Representación de Kaplan Meier de TGF-alfa para el tiempo hasta la progresión/muerte basado en el punto de corte del marcador único exploratorio.

Figura 9: Representación de Kaplan Meier de TGF-alfa para el tiempo hasta la muerte basado en el punto de corte 45 de marcador único exploratorio.

Figura 10: Representación de Kaplan Meier de anfiregulina para el tiempo hasta la progresión/muerte basado en el punto de corte de marcador único exploratorio.

Figura 11: Representación de Kaplan Meier de anfiregulina para el tiempo hasta la muerte basado en el punto de 50 corte de marcador único exploratorio.

Figura 12: Representación de Kaplan Meier de EGF para el tiempo hasta la progresión/muerte basado en el punto de corte de marcador único exploratorio.

Figura 13: Representación de Kaplan Meier de EGF para el tiempo hasta la muerte basado en el punto de corte de 55 marcador único exploratorio.

Figura 14: Representación de Kaplan Meier de HER2-ECD para el tiempo hasta la progresión/muerte basado en el punto de corte de marcador único exploratorio. 60

Figura 15: Representación de Kaplan Meier de HER2-ECD para el tiempo hasta la muerte basado en el punto de corte de marcador único exploratorio.

Figura 16: Como ejemplo para una puntuación de combinación, mejorando además la separación entre los grupos 65 de mayor beneficio clínico/menor beneficio clínico en TTP: combinación de beneficio clínico ordinal de HER2-ECD TGF alfa.

ES 2 356 066 T3

Figura 17: Revisión exploratoria de los valores de los puntos de corte y rango-log de p para TTP y TTD para una combinación de TGF-alfa y HER2-ECD.

Figura 18: Representación de Kaplan Meier de HER2-ECD/TGF-alfa para el tiempo hasta la progresión/muerte basado en el punto de corte de marcador de combinación exploratorio.

Figura 19: Representación de Kaplan Meier de HER2-ECD/TGF-alfa para el tiempo hasta la muerte basado en el punto de corte de marcador de combinación exploratorio.

10

Ejemplos

Observaciones generales a las reglas de predicción

15 La forma general de una regla de predicción consiste en la especificación de una función de uno o múltiples biomarcadores que incluyen potencialmente los covariados clínicos para predecir la respuesta o no respuesta, o más generalmente, predice el beneficio o falta de beneficio en términos de criterios de valoración clínicos definidos adecuadamente.

20 La forma más simple de una regla de predicción consiste en un modelo univariado sin covariados, en el que la predicción se determina por medio de un punto de corte o umbral. Esto puede expresarse en términos de la función Heaviside para un punto de corte específico c una medida de biomarcador x , en el que la predicción binaria A o B debe realizarse, entonces

25 Si $H(x - c) = 0$ entonces predice A.

Si $H(x - c) = 1$ entonces predice B.

30 Esta es la forma más simple de utilizar medidas de biomarcador univariado en las reglas de predicción. Si dicha sencilla regla es suficiente, permite una simple identificación de la dirección del efecto, es decir si niveles altos o bajos de expresión son beneficiosos para el paciente.

35 La situación puede ser más complicada si los covariados clínicos necesitan ser considerados y/o si los múltiples biomarcadores se utilizan en las reglas de predicción multivariado. Para poder ilustrar estas cuestiones se muestran dos ejemplos hipotéticos:

Ajuste de covariado (ejemplo hipotético)

40

Para un biomarcador X se encuentra que en una población de un ensayo clínico con niveles altos de expresión está asociado con un peor pronóstico (análisis univariado). Un análisis más exhaustivo muestra que hay dos tipos de tumor en la población, uno de ellos posee un peor pronóstico que el otro y a la vez la expresión del biomarcador para este grupo de tumores es generalmente superior. Un análisis de covariados ajustado revela que para cada uno de los tipos de tumor la relación de beneficio clínico y el pronóstico es inverso, es decir dentro de los tipos de tumores, niveles de expresión más bajos están asociados con un mejor pronóstico. El efecto opuesto global está enmascarado por el covariado de tipo de tumor - y el análisis de covariado ajustado como parte de la regla de predicción invierte la dirección.

50

Predicción multivariada (ejemplo hipotético)

55 Para un biomarcador X se encuentra que en una población de un ensayo clínico con niveles altos de expresión está ligeramente asociado con un peor pronóstico (análisis univariado). Para un segundo biomarcador Y se realiza una observación similar mediante análisis univariado. La combinación de X e Y revela un buen pronóstico si ambos biomarcadores son bajos. Esto hace que la regla prediga un beneficio si ambos biomarcadores están por debajo de algunos puntos de corte (AND- en conexión con la función de predicción Heaviside). Para la regla de combinación ya no hay una regla sencilla expresable en un sentido univariado. Por ejemplo, con niveles de expresión bajos en X no predice de forma automática un mejor pronóstico.

60

Estos ejemplos sencillos muestran que las reglas de predicción con y sin covariados no pueden juzgarse a nivel univariado de cada biomarcador. La combinación de múltiples biomarcadores más un ajuste potencial por los covariados no permite asignar relaciones sencillas hacia biomarcadores únicos.

65

Métodos estadísticos

Las tareas estadísticas comprenden los siguientes pasos:

- 5 1. Preselección de biomarcadores candidato.
2. Preselección de covariados de pronóstico clínico relevante.
3. Selección de funciones de predicción de biomarcador a un nivel univariado.
- 10 4. Selección de funciones de predicción de biomarcador incluyendo covariados clínicos a un nivel univariado.
5. Selección de funciones de predicción de biomarcador a un nivel multivariado.
- 15 6. Selección de funciones de predicción de biomarcador incluyendo covariados clínicos a un nivel multivariado.

El siguiente texto detalla los diferentes pasos:

20 *Ad1: Preselección de biomarcadores candidato:* La preselección estadística de biomarcadores candidato se orienta a la potencia de la asociación con las mediciones del beneficio clínico. Para este propósito, los diferentes criterios de valoración clínicos pueden transformarse en puntuaciones indirectas derivadas, como por ejemplo, una asignación ordinal del grado de beneficio clínico o puntuaciones de morbilidad respecto al TTP o TTD que evita las observaciones censuradas. Estas medidas indirectas transformadas pueden utilizarse fácilmente para el análisis de correlación simple, p. ej., mediante la aproximación de correlación no paramétrica del rango de Spearman. Una alternativa aquí es utilizar las mediciones de biomarcador como covariados métricos en los modelos de regresión “tiempo hasta el evento”, como p. ej., la regresión de riesgo proporcional de Cox. Dependiendo de la distribución estadística de los valores del biomarcador, este paso puede necesitar algún procesado previo, como p. ej., transformaciones estabilizantes de la varianza y la utilización de escalas adecuadas o, alternativamente, un paso de estandarización como p. ej., utilizar percentiles en lugar de mediciones crudas. Otra aproximación es la inspección de gráficos de dispersión bivariados, p. ej., mostrando la dispersión de (eje x= valor del biomarcador, eje-y= medida del beneficio clínico) en base a un solo paciente. También puede ser útil aquí alguna línea de regresión no paramétrica como p. ej., la que se consigue mediante el suavizado de las curvas, para visualizar la asociación de biomarcador y beneficio clínico.

35 El fin de estas diferentes aproximaciones es la preselección de candidatos de biomarcador, que muestren alguna asociación con el beneficio clínico en al menos una de las mediciones de beneficio empleadas, mientras que los resultados para otras mediciones no sean contradictorios. Cuando están disponibles grupos control, las diferencias en la asociación de biomarcadores con beneficio clínico en los diferentes brazos puede ser un signo de predicción diferencial que hace al biomarcador elegible para una posterior consideración.

40 *Ad2: Preselección de covariados de pronóstico clínico relevante:* El término “covariado clínico” se utiliza aquí para describir toda la otra información sobre el paciente, que está en general disponible en el nivel basal. Estos covariados clínicos comprenden información demográfica como el sexo, la edad, etc., otra información anamnésica, enfermedades concomitantes, terapias concomitantes, resultados de exámenes físicos, parámetros de laboratorio comunes obtenidos, propiedades conocidas del tumor diana, información que cuantifica la extensión de la enfermedad maligna, puntuaciones clínicas realizadas como ECOG o índice de Karnofsky, estadio clínico de la enfermedad, tiempo y resultado de los pretratamientos, e historial de la enfermedad, así como toda la información similar, que pueda estar asociada con el pronóstico clínico. La preselección estadística de los covariados clínicos es paralela a las aproximaciones para la preselección de biomarcadores y también está orientada a la potencia de la asociación con las mediciones de beneficio clínico. Por lo que en principio los mismos métodos se aplican como se considera en I. Además de los criterios estadísticos, también se pueden aplicar criterios desde la experiencia clínica y el conocimiento teórico para preseleccionar covariados clínicos relevantes.

55 El pronóstico mediante covariados clínicos puede influir con el pronóstico de los biomarcadores. Éstos se considerarán para las reglas de predicción refinadas si es necesario.

60 *Ad3: Selección de funciones de predicción de biomarcador a un nivel univariado:* El término “función de predicción” podrá utilizarse en un sentido general para indicar la función numérica de una medición del biomarcador que resulta en un número que se escala para implicar la predicción diana.

Un ejemplo sencillo es la elección de la función Heaviside para un punto de corte c específico y una medición de biomarcador x , en la que debe realizarse la predicción binaria A o B, entonces

65 Si $H(x-c)=0$ entonces predice A.

Si $H(x-c)=1$ entonces predice B.

Esta es probablemente la vía más común de utilizar mediciones de biomarcador univariado en las reglas de predicción. La definición de una función de predicción normalmente recurre a un grupo de datos de entrenamiento existentes que pueden utilizarse para explorar las posibilidades de predicción. Para poder alcanzar un punto de corte c adecuado para el grupo de entrenamiento, se pueden tomar diferentes rutas. Primero, el gráfico de dispersión con la curva suavizada mencionado en 1 puede utilizarse para definir el punto de corte. Alternativamente puede escogerse algún percentil de la distribución, p. ej., la mediana o un cuartil. Los puntos de corte también pueden extraerse de forma sistemática investigando todos los posibles puntos de corte de acuerdo con su potencial de predicción respecto a las mediciones de beneficio clínico. Entonces estos resultados pueden representarse permitiendo una selección manual o para emplear algún algoritmo de búsqueda para la optimización. Esto se realizó en base a los criterios de valoración de TTP y TTD utilizando un modelo Cox, en el que cada punto de corte de prueba se utilizó el biomarcador como un covariado binario. Los criterios de predicción fueron las proporciones de riesgo resultantes. Entonces, los resultados del TTP y TTD pueden considerarse conjuntamente para escoger un punto de corte que muestre la predicción de acuerdo con ambos criterios de valoración.

Otra aproximación no común para escoger una función de predicción puede basarse en un parámetro fijado en un modelo de regresión de Cox obtenido del grupo de entrenamiento con valores del biomarcador (posiblemente transformados) como covariado. Entonces, la predicción puede depender sencillamente de si la proporción de riesgo computada es inferior o mayor de 1.

Otra posibilidad es basar la decisión en alguna proporción de probabilidad (o transformación monótonica de ésta), en la que las densidades de probabilidad de la diana se predeterminaron en el grupo de entrenamiento para la separación de los estados de predicción. Entonces el biomarcador puede aplicarse a alguna función de proporciones de densidad.

Ad4: Selección de funciones de predicción de biomarcador incluyendo covariados clínicos a un nivel univariado: Univariado se refiere aquí a la utilización de un sólo biomarcador - respecto a los covariados clínicos éste puede ser un modelo multivariado. Esta aproximación es paralela a la búsqueda sin covariados clínicos, sólo que estos métodos permiten la incorporación de información de covariado relevante. El método del gráfico de dispersión para escoger un punto de corte permite sólo un uso limitado de covariados, p. ej., un covariado binario puede estar codificado con un color en la representación gráfica. Cuando el análisis recae en alguna aproximación de regresión normalmente se facilita el uso de covariados (también muchos de ellos a la vez). La búsqueda del punto de corte basado en el modelo de Cox descrito en 3, permite la fácil incorporación de covariados y por lo tanto lleva a la búsqueda de un punto de corte univariado ajustado por el covariado. El ajuste mediante covariados puede realizarse como covariados en el modelo o mediante la inclusión en un análisis estratificado.

Las otras elecciones de funciones de predicción también permiten la incorporación de covariados.

Esto es un motivo claro para la elección del modelo de Cox como función de predicción. Existe la opción de estimar la influencia de covariados en un nivel de interacción, que significa que p. ej., para diferentes grupos de edad, se aplican diferentes proporciones de riesgo.

Para las funciones de predicción de tipo proporción de probabilidad, las densidades de predicción deben estimarse incluyendo covariados. Aquí puede utilizarse la metodología de reconocimiento de patrón multivariado o los valores de biomarcador pueden ajustarse mediante regresión múltiple sobre los covariados (antes de la estimación de densidad).

La tecnología CART (Classification And Regression Trees; Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification And Regression Trees. Chapman & Hall (Wadsworth, Inc.): New York, 1984) puede utilizarse para un biomarcador (nivel de medición crudo) más los covariados clínicos utilizando una medida del beneficio clínico como respuesta. Los puntos de corte se buscan de esta manera y se puede encontrar una función de tipo árbol de decisión que involucra los covariados para la predicción. Los puntos de corte y algoritmos escogidos mediante CART están frecuentemente cercanos al óptimo y pueden estar combinados y unificados considerando diferentes mediciones del beneficio clínico.

Ad5: Selección de funciones de predicción de biomarcador a un nivel multivariado: Cuando hay varios candidatos de biomarcador que mantienen su potencial de predicción dentro de las diferentes elecciones de función de predicción univariada, entonces puede alcanzarse una mejora mediante la combinación de biomarcadores, es decir, considerando funciones de predicción multivariadas.

Basado en el modelo de función simple Heaviside, pueden evaluarse combinaciones de biomarcadores, p. ej., considerando gráficos de dispersión de los valores de biomarcador bivariado en los que se indican los puntos de corte óptimos. Entonces, una combinación de biomarcadores pueden alcanzarse mediante la combinación de diferentes funciones Heaviside mediante los operadores lógicos AND y OR para lograr una predicción mejorada.

La tecnología CART (Árboles de clasificación y regresión) puede utilizarse para biomarcadores múltiples (nivel de medición crudo) y una medición del beneficio clínico como respuesta, para alcanzar los puntos de corte para los biomarcadores y funciones para la predicción de tipo árbol de decisión. Los puntos de corte y algoritmos escogidos mediante CART están frecuentemente cercanos al óptimo y pueden combinarse y unificarse considerando las diferentes mediciones del beneficio clínico.

ES 2 356 066 T3

5 3. La regresión de Cox puede emplearse a diferentes niveles. Una primera vía es incorporar los múltiples biomarcadores de forma binaria (es decir, basado en unas funciones Heaviside con algunos puntos de corte). La otra opción es emplear biomarcadores de una forma métrica (tras las transformaciones adecuadas), o una mezcla de una aproximación binaria y métrica. La función de predicción multivariada generada es del tipo Cox como se describe en

La aproximación de la proporción de probabilidad multivariada es difícil de entender pero se presenta como una opción para las funciones de predicción multivariadas.

10 *Ad6: Selección de funciones de predicción de biomarcador incluyendo covariados clínicos a un nivel multivariado:* Si hay covariados clínicos relevantes, puede lograrse una mejora clínica relevante combinando los múltiples biomarcadores con covariados clínicos múltiples. Las diferentes elecciones de función de predicción serán evaluadas respecto a las posibilidades de incluir covariados clínicos.

15 Basado en las combinaciones lógicas simples de las funciones de Heaviside para los biomarcadores, pueden incluirse otros covariados en la función de predicción en base al modelo de regresión logístico obtenido en el grupo de entrenamiento.

20 La tecnología CART y los árboles de decisión generados pueden utilizarse fácilmente con covariados adicionales, que pueden incluirlos en el algoritmo de predicción.

25 Todas las funciones de predicción basadas en la regresión de Cox pueden utilizar otros covariados clínicos. Existe la opción de estimar la influencia de los covariados en un nivel de interacción, lo que significa que p. ej., para diferentes grupos de edad, se aplican diferentes proporciones de riesgo.

La aproximación de la proporción de probabilidad multivariada no es directamente extensible a la utilización de covariados adicionales.

30 Ejemplo 1

35 Valoración de los niveles basales de los ligandos de HER y de HER2 liberado (HER2 ECD), en sueros sanguíneos de pacientes con cáncer de mama metastásico con bajos niveles de expresión de HER2 tratados con Pertuzumab, como se describe a continuación.

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 356 066 T3

Equipos utilizados para la valoración de los biomarcadores de suero:

Marcador	Ensayo	Distribución
HER2-ECD	ELISA HER- 2/neu de Bayer, Núm. Cat.: EL501	DakoCytomation N.V./S.A., Interleuvenlaan 12B, B-3001 Heverlee
Anfiregulina	Sistema de desarrollo de ELISA DuoSet de la anfiregulina humana, Núm. Cat.: DY262	R&D Systems Ltd., 19 Barton Lane, Abingdon OX14 3NB, UK
EGF	Equipo ELISA Quantikine de EGF humano, Núm. Cat.: DEG00	R&D Systems Ltd., 19 Barton Lane, Abingdon OX14 3NB, UK
TGF-alfa	Inmunoensayo Quantikine® de TGF-alfa humano, Núm. Cat.: DTGA00	R&D Systems Ltd., 19 Barton Lane, Abingdon OX14 3NB, UK

Protocolos

HER2-ECD

El ELISA de HER2-ECD se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Anfiregulina

- Preparar todos los reactivos (proporcionados con el equipo), diluciones estándar (proporcionados con el equipo) y muestras.

- Colocar en el marco las tiras de microplaca EvenCoat IgG de cabra anti-ratón (R&D, Núm. Cat. CP002; no proporcionado con el equipo). El marco se llama ahora placa de ELISA.

- Determinar el número necesario de pocillos (número de diluciones estándar + número de muestras).

- Determinar la plantilla de la placa.

ES 2 356 066 T3

- Añadir 100 μ l de anticuerpo de captura diluido (proporcionado con el equipo; 1:180 en PBS) a cada pocillo.
- Incubar a T.A. durante 1 hora.
- 5 - Aspirar cada pocillo y lavar, repitiendo el proceso tres veces para un total de cuatro lavados. Lavar llenando cada pocillo con 400 μ l de tampón de lavado (no proporcionado con el equipo; se utilizó Tween-20 al 0,05% en PBS), utilizando un dispensador multicanal, y posterior aspiración. Tras el último lavado, eliminar cualquier resto de tampón de lavado aspirando. Invertir la placa y golpearla contra toallitas de papel limpias.
- 10 - Añadir 100 μ l de dilución estándar o muestra diluida (ver abajo) por pocillo. Cambiar las puntas tras cada paso de lavado.
 - Cubrir la placa con la tira adhesiva (proporcionada con el equipo).
- 15 - Incubar durante 2 horas a T.A. en una plataforma agitadora.
 - Repetir la aspiración/lavado como se ha descrito antes.
 - Las muestras aspiradas y las soluciones de lavado son tratados con desinfectante de laboratorio.
- 20 - Añadir 100 μ l de anticuerpo de detección (proporcionados con el equipo) diluido 1:180 en diluyente de reactivo (no proporcionado con el equipo; se utilizó BSA al 1% en PBS (Roth; Fracción de Albúmina V, Núm. Cat. T844.2) por pocillo
- 25 - Incubar durante 2 horas a T.A.
 - Repetir la aspiración/lavado como se ha descrito antes.
 - Añadir 100 μ l de dilución de trabajo de Streptavidina-HRP a cada pocillo (proporcionado con el equipo; dilución 1:200 en diluyente de reactivo). Cubrir con una nueva tira adhesiva.
- 30 - Incubar durante 20 min a T.A.
 - Repetir la aspiración/lavado como se ha descrito antes.
- 35 - Añadir 100 μ l de solución de sustrato (R&D, Núm. Cat. DY999; no proporcionada con el equipo) a cada pocillo.
 - Incubar durante 20 min a T.A. Proteger de la luz.
- 40 - Añadir 50 μ l de solución de parada (H_2SO_4 1,5 M (Schwefelsäure reinst, Merck, Núm. Cat. 713); no proporcionado con el equipo) a cada pocillo. Mezclar con cuidado.
 - Determinar la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente, utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

45

Curva estándar de Anfiregulina

- Se preparó una solución de reserva de anfiregulina de 40 ng/ml en BSA al 1% en PBS, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C. Las soluciones de anfiregulina en BSA al 20% en PBS no son estables después de 2 semanas y por lo tanto no se utilizaron. De la solución de reserva en alícuotas de anfiregulina, se preparó la curva estándar de anfiregulina en BSA al 20% en PBS antes de cada experimento. La mayor concentración fue de 1000 pg/ml (dilución 1:40 de la solución de reserva de anfiregulina). Los estándares proporcionados con el equipo de ELISA produjeron una curva estándar lineal. El análisis en Excel de las curvas permitió la determinación de las ecuaciones de la curva para cada ELISA.

55

Muestras de anfiregulina

- 60 Cuando las muestras se diluyeron 1:1 en diluyente de reactivo, todas las muestras estaban en el rango lineal del ELISA. Cada muestra se midió en duplicados. Dependiendo de la calidad de los datos, y de las cantidades suficientes de suero, las determinaciones se repitieron en experimentos posteriores cuando fue necesario.

EGF

- 65 - Preparar todos los reactivos (proporcionados con el equipo), diluciones estándar (proporcionados con el equipo) y muestras.

ES 2 356 066 T3

- Eliminar el exceso de anticuerpo de las tiras de la placa microtitulada (proporcionado con el equipo) del marco. El marco se llama ahora placa de ELISA.

- Determinar el número necesario de pocillos: (número de diluciones estándar + número de muestras) x 2.

- Determinar la plantilla de la placa.

- Añadir 50 μ l de diluyente de ensayo RD1 (proporcionados con el equipo) a cada pocillo.

- Añadir 200 μ l de dilución estándar o muestra diluida (p. ej., 1:20 en diluyente calibrador RD6H) por pocillo. Cambiar las puntas tras cada paso de pipeteado.

- Cubrir la placa con la tira adhesiva (proporcionada con el equipo).

- Incubar durante 2 horas a T.A. en una plataforma agitadora.

- Aspirar cada pocillo y lavar, repitiendo el proceso tres veces para un total de cuatro lavados. Lavar llenando cada pocillo con 400 μ l de tampón de lavado (proporcionado con el equipo), utilizando un dispensador multicanal, y posterior aspiración. Tras el último lavado, eliminar cualquier resto de tampón de lavado aspirando. Invertir la placa y golpearla contra toallitas de papel limpias.

- Las muestras aspiradas y las soluciones de lavado son tratadas con desinfectante de laboratorio.

- Añadir 200 μ l de conjugado (proporcionado con el equipo) a cada pocillo. Cubrir con una nueva tira adhesiva.

- Incubar durante 2 horas a T.A.

- Repetir la aspiración/lavado como se ha descrito antes.

- Añadir 200 μ l de solución de sustrato (proporcionados con el equipo) a cada pocillo.

- Incubar durante 20 min a T.A. Proteger de la luz.

- Añadir 50 μ l de solución de parada (proporcionada con el equipo) a cada pocillo. Mezclar con cuidado.

- Determinar la densidad óptica de cada pocillo en 30 minutos, utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

Curva estándar de EGF

Los estándares proporcionados con el equipo de ELISA produjeron una curva estándar lineal. Concentraciones muy bajas también mostraron resultados detectables.

Muestras de EGF

Se realizaron un total de cuatro ensayos con las muestras. Cada muestra se midió 2 - 5 veces, siendo el número de determinaciones dependiente de la calidad de los resultados (media +/- DE) y de la disponibilidad de cantidad suficiente de suero. Cuando las muestras se diluyeron 1:20 en el diluyente calibrador RD6H, todas las muestras estaban dentro del rango lineal del ELISA.

TGF-alfa

- Preparar todos los reactivos (proporcionados con el equipo), diluciones estándar (proporcionadas con el equipo) y muestras.

- Eliminar el exceso de anticuerpo de las tiras de la placa microtitulada (proporcionada con el equipo) del marco. El marco se llama ahora placa de ELISA.

- Determinar el número necesario de pocillos: (número de diluciones estándar + número de muestras) x 2.

- Determinar la plantilla de la placa.

- Añadir 100 μ l de diluyente de ensayo RD1W (proporcionado con el equipo) a cada pocillo.

- Añadir 50 μ l de dilución estándar o muestra por pocillo. Cambiar las puntas tras cada paso de pipeteado.

ES 2 356 066 T3

- Cubrir la placa con la tira adhesiva (proporcionada con el equipo).

- Incubar durante 2 horas a T.A. en una plataforma agitadora.

5 - Aspirar cada pocillo y lavar, repitiendo el proceso tres veces para un total de cuatro lavados. Lavar llenando cada pocillo con 400 μ l de tampón de lavado (proporcionado con el equipo), utilizando un dispensador multicanal, y posterior aspiración. Tras el último lavado, eliminar cualquier resto de tampón de lavado aspirando. Invertir la placa y golpearla contra toallitas de papel limpias.

10 - Las muestras aspiradas y las soluciones de lavado son tratadas con desinfectante de laboratorio.

- Añadir 200 μ l de conjugado de TGF-alfa (proporcionado con el equipo) a cada pocillo. Cubrir con una nueva tira adhesiva.

15 - Incubar durante 2 horas a T.A.

- Repetir la aspiración/lavado como se ha descrito antes.

- Añadir 200 μ l de solución de sustrato (proporcionada con el equipo) a cada pocillo.

20 - Incubar durante 30 min a T.A. Proteger de la luz.

- Añadir 50 μ l de solución de parada (proporcionada con el equipo) a cada pocillo. Mezclar con cuidado.

25 - Determinar la densidad óptica de cada pocillo en 30 minutos, utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

Curva estándar de TGF-alfa

30 Los estándares proporcionados con el equipo de ELISA produjeron una curva estándar lineal. Concentraciones muy bajas también mostraron resultados detectables.

Muestras de TGF-alfa

35 Se realizaron un total de cuatro ensayos con las muestras. Las muestras se midieron en 2 - 4 ensayos independientes.

Los datos en suero se analizaron para identificar los factores, de los que los niveles basales en suero podrían asociarse con la respuesta al tratamiento de Pertuzumab. Para todos los factores se observó un patrón asimétrico de la distribución (media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo). Para reducir la asimetría se utilizó una transformación monotónica basada en el logaritmo: $\text{Log}(x+1)$. En un análisis univariado, se exploró si los puntos de corte adecuados para los factores podían definirse para relacionarse con la probabilidad de respuesta (en este ejemplo definida como beneficio clínico). Aquí, los pacientes con beneficio clínico se definen como aquellos que alcanzan una respuesta parcial (RP) o una enfermedad mantenida de forma estable durante al menos 6 meses. Se investigaron los gráficos de dispersión de los factores frente a las categorías de respuesta. La Figura 1 y la Figura 2 muestran una representación de las categorías de respuesta clínica frente a la transformación logarítmica de los niveles de TGF-alfa y anfiregulina en suero, respectivamente, para ejemplificar la aproximación.

En base a los gráficos de dispersión, se seleccionaron los puntos de corte de los factores para definir los grupos de pacientes que han experimentado mayor beneficio clínico. La Figura 3 (TGF-alfa), Figura 4 (Anfiregulina), Figura 5 (EGF), y Figura 6 (HER2-ECD) muestran el beneficio clínico en relación con los diferentes agrupamientos de factores basados en los puntos de corte exploratorios calculados para las unidades originales de factor. Los puntos de corte separan algunos de los pacientes sin beneficio clínico, y por lo tanto, elevan la tasa de respuesta para el grupo con mayor beneficio clínico.

55

Ejemplo 2

60 En este ejemplo se utilizaron los puntos de corte exploratorios del Ejemplo 1 para valorar el efecto univariado de los grupos de factores sobre las diferentes mediciones del beneficio clínico del tratamiento con Pertuzumab, utilizando el tiempo hasta la progresión/o muerte (TTP) y el tiempo hasta la muerte (TTD) como criterios de valoración clínicos alternativos. En las estimaciones Kaplan-Meier y pruebas de rango-log para el TTP y/o TTD, se observaron efectos significativos para TGF-alfa, Anfiregulina, EGF y HER2-ECD, como se muestra en la Figura 7.

65 Las representaciones de Kaplan-Meier que muestran la proporción de riesgo para el TTP y TTD (mayor número de eventos observados) se dan en la Figura 8 y Figura 9 (TGF-alfa), 10 y 11 (Anfiregulina), 12 y 13 (EGF), y 14 y 15 (HER2-ECD), y muestran el pronunciado efecto de un agrupamiento basado en estos factores en la evolución clínica de los pacientes tratados con Pertuzumab.

Ejemplo 3

En este ejemplo se utilizaron aproximaciones multivariadas para identificar las combinaciones de los factores que pueden mejorar la identificación de pacientes con un mayor beneficio del tratamiento con Pertuzumab. Los resultados están reflejados como se derivan de una aproximación CART (Árboles de Clasificación y Regresión). La aproximación de la clasificación CART hace necesario especificar como grupo de beneficio todos los valores de beneficio clínico por encima de 0. Se emplearon como variables los niveles en suero de Her2-ECD, TGF-alfa, Anfiregulina y EGF. Se seleccionó una combinación de niveles en suero de Her2-ECD y TGF-alfa para proporcionar mejores resultados. A partir de los resultados de CART se asignaron los puntos de corte para una combinación de niveles en suero de Her2-ECD y TGF-alfa, lo que resulta en una regla para la categorización exploratoria del beneficio clínico en la población de estudio - una combinación de valores bajos en suero de Her2-ECD y TGF-alfa, lo que captura 2/2 PR y 2/3 DE>6 meses en la población de estudio y excluye un número razonable de pacientes con progresión rápida. La Figura 16 muestra el beneficio clínico en relación al agrupamiento de combinación de TGF-alfa/HER2-ECD basado en el punto de corte de la combinación exploratoria. La Figura 17 resume el efecto de una combinación de TGF-alfa y HER2-ECD sobre el TTP y TTD. Las estimaciones de Kaplan-Meier y las proporciones de riesgo dadas en la Figura 18 (TTP) y Figura 19 (TTD) demuestran un efecto significativo del agrupamiento basado en una combinación de estos factores sobre la evolución clínica de los pacientes tratados con Pertuzumab.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para predecir la respuesta a un tratamiento con un inhibidor de la dimerización de HER en un paciente, que comprende los pasos de

a) valorar en una muestra biológica del paciente, en la que la muestra biológica es suero sanguíneo, el nivel de expresión de una

- 10 - proteína marcadora codificada por el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa o una
- combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores en los que la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores consiste en las proteínas marcadoras codificadas por
- 15 - el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2,
- el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico,
- 20 - el gen marcador de la anfiregulina y el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa,
- el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico y el gen marcador de HER2,
- 25 - el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico y el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa,
- el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2,
- 30 - el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2,
- 35 - el gen marcador de la anfiregulina, el gen marcador del factor de crecimiento epidérmico, el gen marcador del factor de crecimiento transformante alfa y el gen marcador de HER2, y

b) predecir la respuesta al tratamiento con el inhibidor de la dimerización de HER en el paciente mediante la evaluación de los resultados del paso a).

40 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el paso a) de valoración de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores comprende

45 a1) la valoración del nivel de expresión de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores,

a2) determinar si el nivel de expresión valorado en el paso a1) está por encima o por debajo del valor umbral.

50 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el valor umbral se determina antes del paso a1) del método de la reivindicación 2 mediante

55 1) la valoración del nivel de expresión de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores en una pluralidad de muestras biológicas de pacientes antes del tratamiento con el inhibidor de la dimerización de HER,

60 2) la correlación de la respuesta de los pacientes tratados con el inhibidor de la dimerización de HER con el nivel de expresión de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por genes marcadores determinados en el paso a) determinando así el valor umbral.

65 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el inhibidor de dimerización de HER inhibe la heterodimerización de HER2 con EGFR o HER3.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el inhibidor de dimerización de HER es un anticuerpo, preferiblemente el anticuerpo 2C4.

ES 2 356 066 T3

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el paciente es un paciente con cáncer, preferiblemente un paciente con cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón o cáncer de próstata.

5 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el nivel de expresión de la proteína marcadora codificada por el gen marcador o la combinación de proteínas marcadoras codificadas por los genes marcadores en la muestra se valora mediante la detección del nivel de expresión de una proteína marcadora o un fragmento de la misma o una combinación de proteínas marcadoras o fragmentos de las mismas codificadas por los genes marcadores.

10 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que el nivel de expresión de la proteína marcadora o el fragmento de la misma o una combinación de proteínas marcadoras o fragmentos de las mismas se detecta utilizando un reactivo que se une específicamente a la proteína marcadora o un fragmento de la misma o a la combinación de proteínas marcadoras o fragmentos de las mismas.

15 9. El método de la reivindicación 8, en el que el reactivo se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o de un derivado de un anticuerpo.

20 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9 en el que el nivel de expresión se determina utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en proteómica, citometría de flujo, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, ensayo inmunosorbente ligado a enzima, ensayo inmunosorbente ligado a enzima multicanal, y variaciones de estos métodos.

25 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 en el que el fragmento de la proteína marcadora es el dominio extracelular de la proteína marcadora de Her2.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el dominio extracelular de la proteína marcadora de Her2 tiene una masa molecular de aproximadamente 105.000 Dalton.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12

30 en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora de la anfiregulina es la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. Núm. 1,

35 en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora del factor de crecimiento epidérmico es la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. Núm. 2,

en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora del factor de crecimiento transformante alfa es la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. Núm. 3, o

40 en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora HER2 es la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. Núm. 4.

45 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 en el que el valor umbral en suero sanguíneo para

- la proteína marcadora del factor de crecimiento transformante alfa está entre 2,0 y 5,0 pg/ml, preferiblemente alrededor de 3,5 pg/ml,

50 - la proteína marcadora del factor de crecimiento epidérmico está entre 100 y 250 pg/ml, preferiblemente alrededor de 150 pg/ml, o

- la proteína marcadora de la anfiregulina está entre 6 y 15 pg/ml, preferiblemente alrededor de 12 pg/ml.

55 15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que el valor umbral en suero sanguíneo del dominio extracelular de la proteína marcadora de Her2 está entre 12 y 22 ng/ml, preferiblemente alrededor de 18 ng/ml.

60 16. El uso de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína marcadora del factor de crecimiento transformante alfa para predecir la respuesta al tratamiento con el anticuerpo 2C4 en un paciente.

65

ES 2 356 066 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
5 <120> Método para predecir la respuesta a un tratamiento
<130> 23220
<150> EP05017663.5
<151> 2005-08-12
10 <160> 14
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 252
15 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
20 <400> 1

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

ES 2 356 066 T3

	Asn	Lys	Thr	Glu	Ser	Glu	Asn	Thr	Ser	Asp	Lys	Pro	Lys	Arg	Lys	Lys
				115				120					125			
5	Lys	Gly	Gly	Lys	Asn	Gly	Lys	Asn	Arg	Arg	Asn	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn
				130				135					140			
10	Pro	Cys	Asn	Ala	Glu	Phe	Gln	Asn	Phe	Cys	Ile	His	Gly	Glu	Cys	Lys
							145		150				155			160
15	Tyr	Ile	Glu	His	Leu	Glu	Ala	Val	Thr	Cys	Lys	Cys	Gln	Gln	Glu	Tyr
							165						170			175
20	Phe	Gly	Glu	Arg	Cys	Gly	Glu	Lys	Ser	Met	Lys	Thr	His	Ser	Met	Ile
							180						185			190
25	Asp	Ser	Ser	Leu	Ser	Lys	Ile	Ala	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Phe	Met
							195									
30	Ser	Ala	Val	Ile	Leu	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Gln	Leu	Arg
							210							215		220
35	Arg	Gln	Tyr	Val	Arg	Lys	Tyr	Glu	Gly	Glu	Ala	Glu	Glu	Arg	Lys	Lys
							225							230		235
40	Leu	Arg	Gln	Glu	Asn	Gly	Asn	Val	His	Ala	Ile	Ala				
							245							250		
45	<210> 2															
	<211> 1207															
	<212> PRT															
	<213> <i>Homo sapiens</i>															
50	<400> 2															
55	Met	Leu	Leu	Thr	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Pro	Val	Val	Ser	Lys	Phe	Ser
	1				5					10					15	
60	Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Ala	Pro	Gln	His	Trp	Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Thr
				20						25				30		
65	Leu	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Ser	Thr	Cys	Val	Gly	Pro	Ala	Pro	Phe	Leu

ES 2 356 066 T3

	485	490	495
5	His Phe Asp Gly Thr Asp Tyr Gly Thr Leu Leu Ser Gln Gln Met Gly		
	500	505	510
10	Met Val Tyr Ala Leu Asp His Asp Pro Val Glu Asn Lys Ile Tyr Phe		
	515	520	525
15	Ala His Thr Ala Leu Lys Trp Ile Glu Arg Ala Asn Met Asp Gly Ser		
	530	535	540
20	Gln Arg Glu Arg Leu Ile Glu Glu Gly Val Asp Val Pro Glu Gly Leu		
	545	550	555
25	Ala Val Asp Trp Ile Gly Arg Arg Phe Tyr Trp Thr Asp Arg Gly Lys		
	565	570	575
30	Ser Leu Ile Gly Arg Ser Asp Leu Asn Gly Lys Arg Ser Lys Ile Ile		
	580	585	590
35	Thr Lys Glu Asn Ile Ser Gln Pro Arg Gly Ile Ala Val His Pro Met		
	595	600	605
40	Ala Lys Arg Leu Phe Trp Thr Asp Thr Gly Ile Asn Pro Arg Ile Glu		
	610	615	620
45	Ser Ser Ser Leu Gln Gly Leu Gly Arg Leu Val Ile Ala Ser Ser Asp		
	625	630	635
50	Leu Ile Trp Pro Ser Gly Ile Thr Ile Asp Phe Leu Thr Asp Lys Leu		
	645	650	655
55	Tyr Trp Cys Asp Ala Lys Gln Ser Val Ile Glu Met Ala Asn Leu Asp		
	660	665	670
60	Gly Ser Lys Arg Arg Arg Leu Thr Gln Asn Asp Val Gly His Pro Phe		
	675	680	685
65	Ala Val Ala Val Phe Glu Asp Tyr Val Trp Phe Ser Asp Trp Ala Met		
	690	695	700
70	Pro Ser Val Ile Arg Val Asn Lys Arg Thr Gly Lys Asp Arg Val Arg		

ES 2 356 066 T3

	705	710	715	720
5	Leu Gln Gly Ser Met	Leu Lys Pro Ser Ser	Leu Val Val Val	His Pro
		725	730	735
10	Leu Ala Lys Pro Gly	Ala Asp Pro Cys	Leu Tyr Gln Asn	Gly Gly Cys
		740	745	750
15	Glu His Ile Cys Lys	Lys Arg Leu Gly	Thr Ala Trp Cys	Ser Cys Arg
		755	760	765
20	Glu Gly Phe Met Lys	Ala Ser Asp Gly	Lys Thr Cys Leu	Ala Leu Asp
		770	775	780
25	Gly His Gln Leu Leu	Ala Gly Gly Glu	Val Asp Leu Lys	Asn Gln Val
		785	790	795
30	Thr Pro Leu Asp Ile	Leu Ser Lys Thr	Arg Val Ser Glu	Asp Asn Ile
		805	810	815
35	Thr Glu Ser Gln His	Met Leu Val Ala	Glu Ile Met Val	Ser Asp Gln
		820	825	830
40	Asp Asp Cys Ala Pro	Val Gly Cys Ser	Met Tyr Ala Arg	Cys Ile Ser
		835	840	845
45	Glu Gly Glu Asp Ala	Thr Cys Gln Cys	Leu Lys Gly Phe	Ala Gly Asp
		850	855	860
50	Gly Lys Leu Cys Ser	Asp Ile Asp Glu	Cys Glu Met Gly	Val Pro Val
		865	870	875
55	Cys Pro Pro Ala Ser	Ser Lys Cys Ile	Asn Thr Glu Gly	Gly Tyr Val
		885	890	895
60	Cys Arg Cys Ser Glu	Gly Tyr Gln Gly	Asp Gly Ile His	Cys Leu Asp
		900	905	910
65	Ile Asp Glu Cys Gln	Leu Gly Val His	Ser Cys Gly Glu	Asn Ala Ser
		915	920	925
70	Cys Thr Asn Thr Glu	Gly Gly Tyr Thr	Cys Met Cys Ala	Gly Arg Leu

ES 2 356 066 T3

	930	935	940
5	Ser Glu Pro Gly Leu Ile Cys Pro Asp Ser Thr Pro Pro Pro His Leu		
	945	950	955
10	Arg Glu Asp Asp His His Tyr Ser Val Arg Asn Ser Asp Ser Glu Cys		
	965	970	975
15	Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys Met Tyr		
	980	985	990
20	Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile		
	995	1000	1005
25	Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu Leu Arg		
	1010	1015	1020
30	His Ala Gly His Gly Gln Gln Gln Lys Val Ile Val Val Ala Val		
	1025	1030	1035
35	Cys Val Val Val Leu Val Met Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Gly		
	1040	1045	1050
40	Ala His Tyr Tyr Arg Thr Gln Lys Leu Leu Ser Lys Asn Pro Lys		
	1055	1060	1065
45	Asn Pro Tyr Glu Glu Ser Ser Arg Asp Val Arg Ser Arg Arg Pro		
	1070	1075	1080
50	Ala Asp Thr Glu Asp Gly Met Ser Ser Cys Pro Gln Pro Trp Phe		
	1085	1090	1095
55	Val Val Ile Lys Glu His Gln Asp Leu Lys Asn Gly Gly Gln Pro		
	1100	1105	1110
60	Val Ala Gly Glu Asp Gly Gln Ala Ala Asp Gly Ser Met Gln Pro		
	1115	1120	1125
65	Thr Ser Trp Arg Gln Glu Pro Gln Leu Cys Gly Met Gly Thr Glu		
	1130	1135	1140
70	Gln Gly Cys Trp Ile Pro Val Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Pro		

ES 2 356 066 T3

5 1145 1150 1155
 Gln Val Met Glu Arg Ser Phe His Met Pro Ser Tyr Gly Thr Gln
 10 1160 1165 1170
 Thr Leu Glu Gly Gly Val Glu Lys Pro His Ser Leu Leu Ser Ala
 15 1175 1180 1185
 Asn Pro Leu Trp Gln Gln Arg Ala Leu Asp Pro Pro His Gln Met
 20 1190 1195 1200
 Glu Leu Thr Gln
 25 1205

<210> 3

<211> 160

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

ES 2 356 066 T3

Val Leu Ile Ile Thr Cys Val Leu Ile His Cys Cys Gln Val Arg Lys
 115 120 125
 5 His Cys Glu Trp Cys Arg Ala Leu Ile Cys Arg His Glu Lys Pro Ser
 130 135 140
 10 Ala Leu Leu Lys Gly Arg Thr Ala Cys Cys His Ser Glu Thr Val Val
 145 150 155 160
 15
 <210> 4
 <211> 1255
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 25 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 30 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30
 35 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45
 40 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60
 45 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80
 50 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95
 55 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110
 60 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125
 65 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser

ES 2 356 066 T3

	130	135	140
5	Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln		
	145	150	155
10	Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn		
	165	170	175
15	Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys		
	180	185	190
20	His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser		
	195	200	205
25	Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys		
	210	215	220
30	Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys		
	225	230	235
35	Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu		
	245	250	255
40	His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val		
	260	265	270
45	Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg		
	275	280	285
50	Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu		
	290	295	300
55	Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln		
	305	310	315
60	Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys		
	325	330	335
65	Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu		
	340	345	350
70	Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys		

ES 2 356 066 T3

	355	360	365
5	Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp		
	370	375	380
10	Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe		
	385	390	395
15	Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro		
	405	410	415
20	Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg		
	420	425	430
25	Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu		
	435	440	445
30	Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly		
	450	455	460
35	Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val		
	465	470	475
40	Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr		
	485	490	495
45	Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His		
	500	505	510
50	Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys		
	515	520	525
55	Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys		
	530	535	540
60	Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys		
	545	550	555
65	Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys		
	565	570	575
70	Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp		

ES 2 356 066 T3

	580	585	590
5	Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys	Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu	
	595	600	605
10	Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln		
	610	615	620
15	Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys		
	625	630	635
20	Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser		
	645	650	655
25	Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly		
	660	665	670
30	Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg		
	675	680	685
35	Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly		
	690	695	700
40	Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu		
	705	710	715
45	Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys		
	725	730	735
50	Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile		
	740	745	750
55	Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu		
	755	760	765
60	Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg		
	770	775	780
65	Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu		
	785	790	795
70	Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg		
	800		

ES 2 356 066 T3

	805	810	815
5	Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly		
	820	825	830
10	Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala		
	835	840	845
15	Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe		
	850	855	860
20	Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp		
	865	870	875
25	Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg		
	885	890	895
30	Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val		
	900	905	910
35	Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala		
	915	920	925
40	Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro		
	930	935	940
45	Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met		
	945	950	955
50	Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe		
	965	970	975
55	Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu		
	980	985	990
60	Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu		
	995	1000	1005
65	Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr		
	1010	1015	1020
65	Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly		

ES 2 356 066 T3

	1025	1030	1035
5	Ala Gly Gly Met Val His His	Arg His Arg Ser Ser	Ser Thr Arg
	1040	1045	1050
10	Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr	Leu Gly Leu Glu Pro	Ser Glu Glu
	1055	1060	1065
15	Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu	Ala Pro Ser Glu Gly	Ala Gly Ser
	1070	1075	1080
20	Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu	Gly Met Gly Ala Ala	Lys Gly Leu
	1085	1090	1095
25	Gln Ser Leu Pro Thr His Asp	Pro Ser Pro Leu Gln	Arg Tyr Ser
	1100	1105	1110
30	Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu	Pro Ser Glu Thr Asp	Gly Tyr Val
	1115	1120	1125
35	Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro	Gln Pro Glu Tyr Val	Asn Gln Pro
	1130	1135	1140
40	Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro	Ser Pro Arg Glu Gly	Pro Leu Pro
	1145	1150	1155
45	Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala	Thr Leu Glu Arg Pro	Lys Thr Leu
	1160	1165	1170
50	Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val	Val Lys Asp Val Phe	Ala Phe Gly
	1175	1180	1185
55	Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu	Tyr Leu Thr Pro Gln	Gly Gly Ala
	1190	1195	1200
60	Ala Pro Gln Pro His Pro Pro	Pro Ala Phe Ser Pro	Ala Phe Asp
	1205	1210	1215
65	Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln	Asp Pro Pro Glu Arg	Gly Ala Pro
	1220	1225	1230
70	Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr	Pro Thr Ala Glu Asn	Pro Glu Tyr

ES 2 356 066 T3

	1235	1240	1245				
	Leu Gly	Leu Asp Val	Pro Val				
5	1250	1255					
10	<210> 5 <211> 1270 <212> DNA <213> <i>Homo sapiens</i>						
15	<400> 5						
20	agacgttcgc	acacctgggt	gccagegccc	cagaggtccc	gggacagccc	gaggegcgcg	60
	gcccgcgcgc	ccgagctccc	caagcctteg	agageggcgc	acactcccgg	tctccactcg	120
	ctcttccaac	accgctcgt	tttggeggca	gctcgtgtcc	cagagaccga	gttgccccag	180
25	agaccgagac	gccgcccgtg	cgaaggacca	atgagagccc	cgctgctacc	gccggcgccg	240
	gtgggtgctgt	cgctcttgat	actcggctca	ggccattatg	ctgctggatt	ggacctcaat	300
30	gacacctact	ctgggaagcg	tgaaccattt	tctggggacc	acagtgctga	tggatttgag	360
	gttacctcaa	gaagtgagat	gtcttcaggg	agtgagattt	ccctgtgag	tgaaatgcct	420
35	tctagtagtg	aaccgtcctc	gggagccgac	tatgactact	cagaagagta	tgataacgaa	480
	ccacaaaatac	ctggctatat	tgctgatgat	tcagtcagag	ttgaacaggt	agttaagccc	540
40	ccccaaaaaca	agacggaaag	tgaaaatact	tcagataaac	ccaaaagaaa	gaaaaagggg	600
	ggcaaaaaatg	gaaaaaatag	aagaaacaga	aagaagaaaa	atccatgtaa	tgcagaattt	660
45	caaaaatttct	gcattcacgg	agaatgcaaa	tatatagagc	acctggaagc	agtaacatgc	720
	aaatgtcagc	aagaatattt	cgggtgaacgg	tgtggggaaa	agtccatgaa	aactcacagc	780
50	atgattgaca	gtagtttatc	aaaaattgca	ttagcagcca	tagctgcctt	tatgtctgct	840
	gtgatcctca	cagctgttgc	tgttattaca	gtccagctta	gaagacaata	cgtcaggaaa	900
55	tatgaaggag	aagctgagga	acgaaagaaa	cttcgacaag	agaatggaaa	tgtacatgct	960
	atagcataac	tgaagataaa	attacaggat	atcacattgg	agtcactgcc	aagtcatagc	1020
60	cataaatgat	gagtcggtec	tctttccagt	ggatcataag	acaatggacc	ctttttgtta	1080
	tgatggtttt	aaactttcaa	ttgtcacttt	ttatgctatt	tctgtatata	aaggtgcacg	1140
65	aaggtaaaaa	gtatTTTTTc	aagttgtaaa	taatttattt	aatattttaat	ggaagtgtat	1200

ES 2 356 066 T3

ttatntttaca gctcattaaa cttnttttaac caaacagaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260
aaaaaaaaaa 1270

5

<210> 6
<211> 4877
10 <212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

15

actgttggga gaggaatcgt atctccatat ttcttctttc agccccaatc caagggttgt 60
20 agctggaact ttccatcagt tcttcctttc tttttcctct ctaagccttt gccttgctct 120
gtcacagtga agtcagccag agcagggctg ttaaactctg tgaaatttgt cataaggggtg 180
25 tcaggtatntt cttactggct tccaaagaaa catagataaa gaaatctttc ctgtggcttc 240
ccttggcagg ctgcattcag aaggctcttc agttgaagaa agagcttggga ggacaacagc 300
acaacaggag agtaaaagat gccccagggc tgaggcctcc gctcaggcag ccgcatctgg 360
30 ggtcaatcat actcaccttg cccgggccat gctccagcaa aatcaagctg ttttcttttg 420
aaagttcaaa ctcatcaaga ttatgctgct cactcttatac attctgttgc cagtagtttc 480
35 aaaatnttagt tttgnttagtc tctcagcacc gcagcactgg agctgtcctg aaggtactct 540
cgcaggaaat gggaaattcta cttgtgtggg tcttgcaccc ttcttaatntt tctcccatgg 600
40 aaatagtatc tnttaggattg acacagaagg aaccaattat gagcaattgg tgggtggatgc 660
tgggtgtctca gtgatcatgg atnttntcatta taatgagaaa agaatactatt ggggtggatntt 720
45 agaaagacaa cttnttgcaaa gagttntttct gaatgggtca aggcaagaga gagtatgtaa 780
tatagagaaa aatgntttctg gaatggcaat aaatntggata aatgaagaag tntatntggctc 840
50 aaatcaacag gaaggaatca ttacagtaac agatatgaaa ggaaataaatt cccacattct 900
tnttaagtgtc tntaaaatac ctgcaaatgt agcagnttgat ccagtagaaa ggtnttatatt 960
55 tntggtcttca gaggtggctg gaagcctntta tagagcagat ctcgatgggtg tgggagtgaa 1020
ggctctgntt gagacatcag agaaaataac agctgtgtca tntggatgtgc tntgataagcg 1080
60 gctgnttttg atntcagtaca acagagaagg aagcaatntct cttatnttgct cctgtgatta 1140
tgatggaggt tctgtccaca tntagtaaaca tccaacacag cataatnttgt tntgcaatgtc 1200
65 cttnttttgg gaccgtatct tctatntcaac atggaaaatg aagacaatntt ggatagccaa 1260

ES 2 356 066 T3

caaacacact ggaaaggaca tggttagaat taacctccat tcatcatttg taccacttgg 1320
5 tgaactgaaa gtagtgcac cacttgcaca acccaaggca gaagatgaca cttgggagcc 1380
tgagcagaaa ctttgcaaat tgaggaaagg aaactgcagc agcactgtgt gtgggcaaga 1440
10 cctccagtca cacttgtgca tgtgtgcaga gggatacgcc ctaagtcgag accggaagta 1500
ctgtgaagat gttaatgaat gtgctttttg gaatcatggc tgtactcttg ggtgtaaaaa 1560
15 caccctgga tcctattact gcacgtgccc tgtaggattt gttctgcttc ctgatgggaa 1620
acgatgtcat caacttgttt cctgtccacg caatgtgtct gaatgcagcc atgactgtgt 1680
tctgacatca gaaggtccct tatgtttctg tcctgaaggc tcagtgttg agagagatgg 1740
20 gaaaacatgt agcggttgtt cctcacccga taatggtgga tgtagccagc tctgcgttcc 1800
tcttagccca gtatcctggg aatgtgattg ctttctggg tatgacctac aactggatga 1860
25 aaaaagctgt gcagcttcag gaccacaacc atttttgctg tttgccatt ctcaagatat 1920
tcgacacatg cttttgatg gaacagacta tggaaactctg ctcagccagc agatgggaat 1980
30 ggtttatgcc ctagatcatg accctgtgga aaataagata tactttgccc atacagccct 2040
gaagtggata gagagagcta atatggatgg ttcccagcga gaaaggctta ttgaggaagg 2100
35 agtagatgtg ccagaaggtc ttgctgtgga ctggattggc cgtagattct attggacaga 2160
cagagggaaa tctctgattg gaaggagtga tttaaatggg aaacgttcca aaataatcac 2220
40 taaggagaac atctctcaac cacgaggaat tgctgttcat ccaatggcca agagattatt 2280
ctggactgat acagggatta atccacgaat tgaaagttct tcctccaag gccttgccg 2340
45 tctggttata gccagctctg atctaactctg gccagtgga ataacgattg acttcttaac 2400
tgacaagttg tactggtgcg atgccaagca gtctgtgatt gaaatggcca atctggatgg 2460
50 ttcaaaacgc cgaagactta ccagaatga tgtaggtcac ccatttgctg tagcagtgtt 2520
tgaggattat gtgtggttct cagattgggc tatgccatca gtaataagag taaacaagag 2580
gactggcaaa gatagagtac gtctccaagg cagcatgctg aagccctcat cactggttgt 2640
55 ggttcatcca ttggcaaac caggagcaga tcctgctta tatcaaacg gaggtgtga 2700
acatatttgc aaaaagaggc ttggaactgc ttggtgttcg tgtcgtgaag gttttatgaa 2760
60 agcctcagat gggaaaacgt gtctggctct ggatggtcat cagctgttg caggtggtga 2820
agttgatcta aagaaccaag taacaccatt ggacatcttg tccaagacta gagtgtcaga 2880
65 agataacatt acagaatctc aacacatgct agtggctgaa atcatggtgt cagatcaaga 2940

ES 2 356 066 T3

tgactgtgct cctgtgggat gcagcatgta tgctcgggtg atttcagagg gagaggatgc 3000
 cacatgtcag tgtttgaaag gatttgctgg ggatggaaaa ctatgttctg atatagatga 3060
 5 atgtgagatg ggtgtcccag tgtgcccccc tgctctctcc aagtgcatac acaccgaagg 3120
 tggttatgtc tgccgggtgct cagaaggcta ccaaggagat gggattcact gtcttgatat 3180
 10 tgatgagtgc caactggggg tgcacagctg tggagagaat gccagctgca caaatacaga 3240
 gggaggctat acctgcatgt gtgctggacg cctgtctgaa ccaggactga tttgccctga 3300
 15 ctctactcca cccctcacc tcaggaaga tgaccaccac tattccgtaa gaaatagtga 3360
 ctctgaatgt ccctgtccc acgatgggta ctgcctccat gatgggtgtg gcatgtatat 3420
 20 tgaagcattg gacaagtatg catgcaactg tgttgttggc tacatcgggg agcgatgtca 3480
 gtaccgagac ctgaagtggg gggaactgcg ccacgctggc cacgggcagc agcagaagg 3540
 25 catcgtggtg gctgtctgcg tgggtgggtgct tgtcatgctg ctctctctga gcctgtgggg 3600
 ggcccactac tacaggactc agaagctgct atcgaaaaac ccaaagaatc cttatgagga 3660
 30 gtcgagcaga gatgtgagga gtcgcaggcc tgctgacact gaggatggga tgcctcttg 3720
 ccctcaacct tggtttgtgg ttataaaaga acaccaagac ctcaagaatg ggggtcaacc 3780
 35 agtggctggg gaggatggcc aggcagcaga tgggtcaatg caaccaactt catggaggca 3840
 ggagccccag ttatgtggaa tgggcacaga gcaaggctgc tggattccag tatccagtga 3900
 40 taagggtctc tgtccccagg taatggagcg aagctttcat atgccctcct atgggacaca 3960
 gacccttgaa gggggtgctg agaagcccc a ttctctcta tcagctaacc cattatggca 4020
 45 acaaagggcc ctggaccac cacaccaaat ggagctgact cagtgaaaac tggaaattaa 4080
 aggaaagtca agaagaatga actatgtcga tgcacagtat cttttctttc aaaagtagag 4140
 caaaactata ggttttggtt ccacaatctc tacgactaat cacctactca atgcctggag 4200
 50 acagatacgt agttgtgctt ttgtttgctc ttttaagcag tctcactgca gtcttatttc 4260
 caagtaagag tactgggaga atcactaggt aacttattag aaacccaaat tgggacaaca 4320
 55 gtgctttgta aattgtggtt tcttcagcag tcaatacaaa tagatTTTTTg tttttgttgt 4380
 tcctgcagcc ccagaagaaa ttaggggtta aagcagacag tcacactggg ttggtcagtt 4440
 60 acaaagtaat ttctttgatc tggacagaac atttatatca gtttcatgaa atgattggaa 4500
 tattacaata ccgttaagat acagtgtagg catttaactc ctcatggcg tggccatgc 4560
 65 tgatgatttt gccaaaatga gttgtgatga atcaatgaaa aatgtaattt agaaactgat 4620

ES 2 356 066 T3

ttcttcagaa ttagatggcc ttatTTTTTA aaatatttga atgaaaacat tttatTTTTA 4680
5 aaatattaca caggaggcct tcggagtttc ttagtcatta ctgtcctttt cccctacaga 4740
atTTTccctc ttgggtgatg tgcacagaat ttgtatgtat tttcagttac aagattgtaa 4800
gtaaattgcc tgatttgttt tcattataga caacgatgaa tttcttctaa ttattttaaT 4860
10 aaaatcacca aaaacat 4877

15 <210> 7
<211> 4119
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*
20 <400> 7

25 ctggagagcc tgctgcccgc ccgcccgtaa aatggTcccc tcggctggac agctcgcctt 60
gttcgctctg ggtattgtgt tggctgcgtg ccaggccttg gagaacagca cgtccccgct 120
gagtgcagac ccgcccgtgg ctgcagcagt ggtgtcccat ttaaatgact gccagattc 180
30 ccacactcag ttctgcttcc atggaacctg caggTttttg gtgcaggagg acaagccagc 240
atgtgtctgc cattctgggt acgttggTgc acgctgtgag catgcggacc tcctggccgt 300
35 ggtggctgcc agccagaaga agcaggccat caccgccttg gtggtggTct ccatcgtggc 360
cctggctgtc cttatcatca catgtgtgct gatacactgc tgccaggTcc gaaaacactg 420
40 tgagtggTgc cgggcccTca tctgccggca cgagaagccc agcgccttcc tgaagggag 480
aaccgcttgc tgccactcag aaacagtggT ctgaagagcc cagaggagga gtttggccag 540
45 gtggactgtg gcagatcaat aaagaaaggc ttcttcagga cagcactgcc agagatgcct 600
gggtgtgcca cagaccttcc tacttggcct gtaatcacct gtgcagcctt ttgtgggcct 660
50 tcaaaactct gtcaagaact ccgtctgctt ggggttattc agtgtgacct agagaagaaa 720
tcagcggacc acgatttcaa gacttgTtaa aaaagaactg caaagagacg gactcctgtt 780
55 cacctaggTg aggtgtgtgc agcagttggT gtctgagtcc acatgtgtgc agttgtcttc 840
tgccagccat ggattccagg ctatatattt ctttttaatg ggccacctcc ccacaacaga 900
60 attctgcccc acacaggaga tttctatagt tattgttttc tgtcatttgc ctactgggga 960
agaaagtgaa ggaggggaaa ctgtttaaata tcacatgaag accctagctt taagagaagc 1020
65 tgtatcctct aaccacgaga ctctcaacca gcccaacatc ttccatggac acatgacatt 1080

ES 2 356 066 T3

gaagaccatc ccaagctatc gccacccttg gagatgatgt cttatattatt agatggataa 1140
5 tggtttttatt tttaatctct taagtcaatg taaaaagtat aaaaccctt cagacttcta 1200
cattaatgat gtatgtgttg ctgactgaaa agctatactg attagaaatg tctggcctct 1260
10 tcaagacagc taaggcttgg gaaaagtctt ccagggtgcg gagatggaac cagaggctgg 1320
gttactggta ggaataaagg taggggttca gaaatggtgc cattgaagcc acaaagccgg 1380
15 taaatgcctc aatacgttct gggagaaaac ttagcaaatc catcagcagg gatctgtccc 1440
ctctgttggg gagagaggaa gagtgtgtgt gtctacacag gataaaccca atacatattg 1500
tactgctcag tgattaaatg ggttcacttc ctctgagacc ctctgtaagt atgtttagaa 1560
20 atagaacatt agccacgagc cataggcatt tcaggccaaa tccatgaaag ggggaccagt 1620
catttatttt ccattttgtt gcttggttgg tttgttgctt tatttttaaa aggagaagtt 1680
25 taactttgct atttattttc gagcactagg aaaactattc cagtaatttt ttttctca 1740
tttccattca ggatgccggc tttattaaca aaaactctaa caagtcacct ccactatgtg 1800
30 ggtcttcctt tcccctcaag agaaggagca attgttcccc tgacatctgg gtccatctga 1860
cccatggggc ctgcctgtga gaaacagtgg gtcccctcaa atacatagtg gatagctcat 1920
35 ccctaggaat tttcattaaa atttggaac agagtaatga agaaataata tataaactcc 1980
ttatgtgagg aaatgctact aatatctgaa aagtgaaaga tttctatgta ttaactctta 2040
40 agtgcaccta gcttattaca tcgtgaaagg tacatttaaa atatgttaaa ttggcttgaa 2100
attttcagag aattttgtct tcccctaatt cttcttcctt ggtctggaag aacaatttct 2160
45 atgaattttc tctttatttt tttttataa ttcagacaat tctatgacct gtgtcttcat 2220
ttttggcact cttatttaac aatgccacac ctgaagcact tggatctgtt cagagctgac 2280
cccctagcaa cgtagttgac acagctccag gtttttaaat tactaaaata agttcaagtt 2340
50 tacatccctt gggccagata tgtgggttga ggcttgactg tagcatcctg cttagagacc 2400
aatcaatgga cactggtttt tagacctcta tcaatcagta gttagcatcc aagagacttt 2460
55 gcagaggcgt aggaatgagg ctggacagat ggcggaacga gaggttcctt gcgaagactt 2520
gagatttagt gtctgtgaat gttctagttc ctaggctccag caagtcacac ctgccagtgc 2580
60 cctcatcctt atgcctgtaa cacacatgca gtgagaggcc tcacatatac gcctccctag 2640
aagtgccttc caagtcagtc ctttggaac cagcaggtct gaaaagagg ctgcatcaat 2700
65 gcaagcctgg ttggaccatt gtccatgcct caggatagaa cagcctggct tatttgggga 2760

ES 2 356 066 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

ttttttcttct agaaatcaaa tgactgataa gcattggctc cctctgccat ttaatggcaa 2820
tggtagtctt tggttagctg caaaaatact ccatttcaag ttaaaaatgc atcttctaata 2880
ccatctctgc aagctccctg tgtttccttg cccttttagaa aatgaattgt tcactacaat 2940
tagagaatca tttaacatcc tgacctggta agctgccaca cacctggcag tggggagcat 3000
cgctgtttcc aatggctcag gagacaatga aaagccccc a tttaaaaaaa taacaaacat 3060
tttttaaaag gcctccaata ctcttatgga gcctggattt ttcccactgc tctacaggct 3120
gtgacttttt ttaagcatcc tgacaggaaa tgttttcttc tacatggaaa gatagacagc 3180
agccaaccct gatctggaag acagggcccc ggctggacac acgtggaacc aagccagggg 3240
tgggctggcc attgtgtccc cgcaggagag atgggcagaa tggccctaga gttcttttcc 3300
ctgagaaaagg agaaaaagat gggattgcc a ctcaccacc cacactggta agggaggaga 3360
atgtgtgctt ctggagcttc tcaagggatt gtgttttgca ggtacagaaa actgcctggt 3420
atcttcaagc caggttttcg agggcacatg ggtcaccagt tgctttttca gtcaatttgg 3480
ccgggatgga ctaatgaggc tctaactctg ctcaggagac ccctgccctc tagttggttc 3540
tgggctttga tctcttccaa cctgccagc cacagaagga ggaatgactc aaatgccc a 3600
aaccaagaac acattgcaga agtaagacaa acatgtatat ttttaa atgt tctaacataa 3660
gacctgttct ctctagccat tgatttacca ggctttctga aagatctagt ggttcacaca 3720
gagagagaga gagtactgaa aaagcaactc ctcttcttag tcttaataat ttactaaaat 3780
ggtcaacttt tcattatctt tattataata aacctgatgc ttttttttag aactccttac 3840
tctgatgtct gtatatgttg cactgaaaag gttaaatattt aatgttttaa tttattttgt 3900
gtggtaagtt aattttgatt tctgtaatgt gttaatgtga ttagcagtta ttttccttaa 3960
tatctgaatt atacttaaag agtagtgagc aatataagac gcaattgtgt ttttcagtaa 4020
tgtgcattgt tattgagttg tactgtacct tatttggaag gatgaaggaa tgaacctttt 4080
tttcttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4119

<210> 8

<211> 4624

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 356 066 T3

<400> 8

5 ggaggagggtg gaggaggagg gctgcttgag gaagtataag aatgaagttg tgaagctgag 60
 attccccctcc attgggaccg gagaaaccag gggagcccc cgggcagccg cgcgccctt 120
 cccacggggc cctttactgc gccgcgcgcc cggccccac cctcgcagc accccgcgcc 180
 10 ccgcgccctc ccagccgggt ccagccggag ccatggggcc ggagccgcag tgagcaccat 240
 ggagctggcg gccttggtcc gctgggggct cctcctcgcc ctcttgcccc ccggagccgc 300
 15 gagcaccocaa gtgtgcaccg gcacagacat gaagctgcgg ctccctgccca gtcccagac 360
 ccacctggac atgctccgcc acctctacca gggctgccag gtggtgcagg gaaacctgga 420
 20 actcaacctac ctgcccacca atgccagcct gtccttctg caggatatcc aggaggtgca 480
 gggctacgtg ctcatcgctc acaaccaagt gaggcaggtc cactgcaga ggctgcggat 540
 25 tgtgcgaggc acccagctct ttgaggacaa ctatgccctg gccgtgctag acaatggaga 600
 cccgtgaac aataccacc cgtgcacagg ggctcccca ggaggcctgc gggagctgca 660
 30 gcttogaagc ctcacagaga tcttgaaagg aggggtcttg atccagcggga acccccagct 720
 ctgctaccag gacacgattt tgtggaagga catcttccac aagaacaacc agctggctct 780
 35 cacactgata gacaccaacc gctctcgggc ctgccacccc tgttctccga tgtgtaaggg 840
 ctcccgtgc tggggagaga gttctgagga ttgtcagagc ctgacgcgca ctgtctgtgc 900
 cgggtggctgt gcccgtgca agggggcact gccactgac tgctgccatg agcagtgtgc 960
 40 tgccggctgc acgggcccc aagcactctga ctgcctggcc tgccctcact tcaaccacag 1020
 tggcatctgt gagctgcact gccagccct ggtcacctac aacacagaca cgtttgagtc 1080
 45 catgcccacat cccgagggcc ggtatacatt cggcgcagc tgtgtgactg cctgtcccta 1140
 caactacctt tctacggacg tgggatcctg caccctcgtc tgccccctgc acaaccaaga 1200
 50 ggtgacagca gaggatggaa cacagcggty tgagaagtgc agcaagccct gtgcccagat 1260
 gtgctatggt ctgggcatgg agcacttgcy agaggtgagg gcagttacca gtgccaatat 1320
 55 ccaggagttt gctggctgca agaagatctt tgggagcctg gcatttctgc cggagagctt 1380
 tgatggggac ccagcctcca aactgcccc gctccagcca gagcagctcc aagtgtttga 1440
 60 gactctggaa gagatcacag gttacctata catctcagca tggccggaca gcctgcctga 1500
 cctcagcgtc ttccagaacc tgcaagtaat ccggggacga attctgcaca atgggcctta 1560
 ctcgtgacc ctgcaagggc tgggcatcag ctggctgggg ctgcgctcac tgaggggaact 1620
 65 gggcagtgga ctggccctca tccaccataa caccacctc tgcttcgtgc acacgggtgcc 1680

ES 2 356 066 T3

ctgggaccag ctctttcggg acccgcacca agctctgctc cacactgcca accggccaga 1740
ggacgagtgt gtgggcgagg gcctggcctg ccaccagctg tgcgccccgag ggcactgctg 1800
5 ggggccaggg cccacccagt gtgtcaactg cagccagttc ctctggggcc aggagtgcgt 1860
ggaggaatgc cgagtactgc aggggctccc cagggagtat gtgaatgcca ggcactgttt 1920
10 gccgtgccac cctgagtgtc agccccagaa tggctcagtg acctgttttg gaccggaggc 1980
tgaccagtgt gtggcctgtg cccactataa ggaccctccc ttctgcgtgg cccgctgccc 2040
15 cagcgggtgtg aaacctgacc tctcctacat gcccatctgg aagtttccag atgaggaggg 2100
cgcatgccag ccttgcccca tcaactgcac ccactcctgt gtggacctgg atgacaaggg 2160
20 ctgccccgcc gagcagagag ccagccctct gacgtccatc atctctgcgg tggttggcat 2220
tctgctggtc gtggctcttg ggggtgtctt tgggatcctc atcaagcgac ggcagcagaa 2280
25 gatccggaag tacacgatgc ggagactgct gcaggaaacg gagctgggtg agccgctgac 2340
acctagcggg gcgatgccca accagggcga gatgcggatc ctgaaagaga cggagctgag 2400
30 gaaggtgaag gtgcttgat ctggcgcttt tggcacagtc tacaagggca tctggatccc 2460
tgatggggag aatgtgaaaa ttccagtggc catcaaagtg ttgagggaaa acacatcccc 2520
caaagccaac aaagaaatct tagacgaagc atacgtgatg gctgggtgtg gctccccata 2580
35 tgtctcccgc cttctgggca tctgcctgac atccacggtg cagctgggtga cacagcttat 2640
gccctatggc tgctcttag acctgtccg ggaaaaccgc ggacgcctgg gctcccagga 2700
40 cctgctgaac tgggtgatgc agattgcaa ggggatgagc tacctggagg atgtgcggct 2760
cgtacacagg gacttggccg ctcggaacgt gctgggtcaag agtcccaacc atgtcaaaat 2820
45 tacagacttc gggctggctc ggctgctgga cattgacgag acagagtacc atgcagatgg 2880
gggcaagggtg cccatcaagt ggatggcgt ggagtccatt ctccgccggc ggttcaccca 2940
50 ccagagtgat gtgtggagtt atgggtgtgac tgtgtgggag ctgatgactt ttggggccaa 3000
accttacgat gggatcccag cccgggagat ccctgacctg ctggaaaagg gggagcggct 3060
55 gccccagccc cccatctgca ccattgatgt ctacatgatc atgggtcaaat gttggatgat 3120
tgactctgaa tgtcggccaa gattccggga gttgggtgtc gaattctccc gcatggccag 3180
60 ggacccccag cgctttgtgg tcatccagaa tgaggacttg ggcccagcca gtcccttggg 3240
cagcaccttc taccgctcac tgctggagga cgatgacatg ggggacctgg tggatgctga 3300
65 ggagtatctg gtaccccagc agggcttctt ctgtccagac cctgccccgg gcgctggggg 3360

ES 2 356 066 T3

catggtccac cacagggcacc gcagctcatc taccaggagt ggcgggtgggg acctgacact 3420
 5 agggctggag ccctctgaag aggaggcccc caggtctcca ctggcaccct ccgaaggggc 3480
 tggctccgat gtatttgatg gtgacctggg aatgggggca gccaaagggc tgcaaagcct 3540
 10 cccacacat gaccccagcc ctctacagcg gtacagtgag gaccccacag taccctgccc 3600
 ctctgagact gatggctaag ttgccccct gacctgcagc cccagacctg aatatgtgaa 3660
 ccagccagat gttcggcccc agcccccttc gccccgagag ggcctctgc ctgctgcccc 3720
 15 acctgctggt gccactctgg aaaggcccaa gactctctcc ccagggaaga atggggtcgt 3780
 caaagacggt tttgcctttg ggggtgccgt ggagaacccc gagtacttga cccccaggg 3840
 20 aggagctgcc cctcagcccc accctctctc tgccttcagc ccagccttcg acaacctcta 3900
 ttactgggac caggacccac cagagcgggg ggctccaccc agcaccttca aaggacacc 3960
 25 tacggcagag aaccagagat acctgggtct ggacgtgcca gtgtgaacca gaaggccaag 4020
 tccgcagaag ccctgatgtg tctcagggg gcaggggaagg cctgacttct gctggcatca 4080
 30 agaggtggga gggccctccg accacttcca ggggaacctg ccatgccagg aacctgtcct 4140
 aaggaacctt ccttctctgt tgagttccca gatggctgga aggggtccag cctcgttgga 4200
 35 agaggaacag cactggggag tctttgtgga ttctgaggcc ctgcccaatg agactctagg 4260
 gtccagtgga tgccacagcc cagcttggcc ctttctctcc agatcctggg tactgaaagc 4320
 40 cttaggggaag ctggcctgag aggggaagcg gccctaaggg agtgtctaag aacaaaagcg 4380
 acccattcag agactgtccc tgaaacctag tactgcccc catgaggaag gaacagcaat 4440
 45 ggtgtcagta tccaggcttt gtacagagtg cttttctggt tagtttttac tttttttggt 4500
 ttgttttttt aaagatgaaa taaagaccca gggggagaat ggggtttgta tggggaggca 4560
 50 agtgtggggg gtccttctcc acaccactt tgtccatttg caaatatatt ttggaaaaca 4620
 gcta 4624

55 <210> 9
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 60

65

ES 2 356 066 T3

<400> 9

```

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

```

60 <210> 10

<211> 1050

<212> DNA

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 356 066 T3

<400> 10

```

5      acacacacac acccctcccc tgccatccct ccccggactc cggctccggc tccgattgca      60
      atttgcaacc tccgctgccg tcgccgcagc agccaccaat tcgccagcgg ttcaggtggc      120
      tcttgccctcg atgtcctagc ctagggggccc ccggggccgga cttggctggg ctcccttcac      180
10     cctctgcgga gtcattgaggg cgaacgacgc tctgcaggtg ctgggcttgc ttttcagcct      240
      ggccccggggc tccgaggtgg gcaactctca ggcagtgtgt cctgggactc tgaatggcct      300
15     gagtgtgacc ggcgatgctg agaaccaata ccagacactg tacaagctct acgagaggtg      360
      tgaggtgggtg atgggggaacc ttgagattgt gctcacggga cacaatgccg acctctcctt      420
20     cctgcagtggt attcgagaag tgacaggcta tgtcctcgtg gccatgaatg aattctctac      480
      tctaccattg cccaacctcc gcgtggtgcg agggaccagc gtctacgatg ggaagtttgc      540
25     catcttcgtc atggttgaact ataacaccaa ctccagccac gctctgcgcc agctccgctt      600
      gactcagctc accggtcagt tcccgatggt tccttctggc ctcaccctc agccagccca      660
30     agactggtac ctcccttgatg atgacccaag actgctcact ctaagtgcct cttccaaggt      720
      gcctgtcacc ttggccgctg tctaaaggct cattgtctcc taagcaatag agggccccca      780
35     gtaggggggag ctaggggcat ctgctccagg gaaaggaacc ctgtgtcctt gtggggctgg      840
      agtcagagct ggatctgtta accgtttttc taatttcaaa gtacagtgta ccggaggcca      900
40     ggctgatggt cttacacctg taatcccagc attttgggag gccaaggagg gcagatcact      960
      tgagatcagg agtttgagac cagcctggcc aacatggcga aaccctgtct ctactaaaaa      1020
45     taaaaaaaaa taaaataaaa taaaaaatta                                     1050

```

<210> 11

<211> 1210

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

55     Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
      1           5           10           15
60     Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
      20           25           30
65     Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

```


ES 2 356 066 T3

	260	265	270
5	Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly		
	275	280	285
10	Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His		
	290	295	300
15	Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu		
	305	310	315
20	Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val		
	325	330	335
25	Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
	340	345	350
30	Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		
	355	360	365
35	Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
	370	375	380
40	Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
	385	390	395
45	Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp		
	405	410	415
50	Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln		
	420	425	430
55	His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu		
	435	440	445
60	Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser		
	450	455	460
65	Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu		
	465	470	475
70	Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu		

ES 2 356 066 T3

	485	490	495
5	Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro		
	500	505	510
10	Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn		
	515	520	525
15	Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly		
	530	535	540
20	Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro		
	545	550	555
25	Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro		
	565	570	575
30	Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val		
	580	585	590
35	Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp		
	595	600	605
40	Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys		
	610	615	620
45	Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly		
	625	630	635
50	Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu		
	645	650	655
55	Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His		
	660	665	670
60	Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu		
	675	680	685
65	Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu		
	690	695	700
70	Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser		

ES 2 356 066 T3

	705	710	715	720
5	Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu			
		725	730	735
10	Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser			
		740	745	750
15	Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser			
		755	760	765
20	Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser			
		770	775	780
25	Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp			
		785	790	795
30	Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn			
		805	810	815
35	Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg			
		820	825	830
40	Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro			
		835	840	845
45	Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala			
		850	855	860
50	Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp			
		865	870	875
55	Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp			
		885	890	895
60	Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser			
		900	905	910
65	Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu			
		915	920	925
70	Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr			

ES 2 356 066 T3

	930	935	940
5	Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys		
	945	950	955
10	Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln		
	965	970	975
15	Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro		
	980	985	990
20	Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp		
	995	1000	1005
25	Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe		
	1010	1015	1020
30	Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu		
	1025	1030	1035
35	Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn		
	1040	1045	1050
40	Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg		
	1055	1060	1065
45	Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp		
	1070	1075	1080
50	Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro		
	1085	1090	1095
55	Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln		
	1100	1105	1110
60	Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro		
	1115	1120	1125
65	His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln		
	1130	1135	1140
70	Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala		

ES 2 356 066 T3

	1145	1150	1155
5	Gln Lys Gly Ser His Gln Ile	Ser Leu Asp Asn Pro	Asp Tyr Gln
	1160	1165	1170
10	Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu	Ala Lys Pro Asn Gly	Ile Phe Lys
	1175	1180	1185
15	Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala	Glu Tyr Leu Arg Val	Ala Pro Gln
	1190	1195	1200
20	Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala		
	1205	1210	
25	<210> 12		
	<211> 628		
	<212> PRT		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
30	<400> 12		
35	Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala	Leu Leu Ala Leu Leu Ala	
	1	5	10
40	Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln		
	20	25	30
45	Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe		
	35	40	45
50	Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn		
	50	55	60
55	Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys		
	65	70	75
60	Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val		
	85	90	95
65	Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr		
	100	105	110

ES 2 356 066 T3

	Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
	340	345	350
5	Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		
	355	360	365
10	Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
	370	375	380
15	Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
	385	390	395
20	Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp		
	405	410	415
25	Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln		
	420	425	430
30	His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu		
	435	440	445
35	Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser		
	450	455	460
40	Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu		
	465	470	475
45	Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu		
	485	490	495
50	Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro		
	500	505	510
55	Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn		
	515	520	525
60	Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly		
	530	535	540
65	Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro		
	545	550	555
			560

ES 2 356 066 T3

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 5 565 570 575
 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 10 580 585 590
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 15 595 600 605
 Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 20 610 615 620
 Thr Tyr Gly Ser
 25 <210> 13
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 13
 35 Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 40 20 25 30
 Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 45 35 40 45
 Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 50 55 60
 Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 55 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 60 85 90 95
 Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 65

ES 2 356 066 T3

	325	330	335
5	Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
	340	345	350
10	Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		
	355	360	365
15	Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
	370	375	380
20	Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
	385	390	395
	Ile Thr Gly Leu Ser		400
25		405	
	<210> 14		
30	<211> 705		
	<212> PRT		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
35	<400> 14		
	Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala		
40	1	5	10
	Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln		15
45		20	25
	Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe		30
50		35	40
	Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn		45
55		50	55
	Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys		60
60		65	70
	Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val		75
65		85	90
			95

ES 2 356 066 T3

	Glu Arg Ile Pro Leu	Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly	Asn Met Tyr
5	100	105	110
	Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn		
10	115	120	125
	Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu		
15	130	135	140
	His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu		
20	145	150	155
	Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met		
25	165	170	175
	Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro		
30	180	185	190
	Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln		
35	195	200	205
	Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg		
40	210	215	220
	Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys		
45	225	230	235
	Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp		
50	245	250	255
	Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro		
55	260	265	270
	Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly		
60	275	280	285
	Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His		
65	290	295	300
	Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu		
65	305	310	315
			320

ES 2 356 066 T3

	Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val		
	325	330	335
5	Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
	340	345	350
10	Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		
	355	360	365
15	Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
	370	375	380
20	Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
	385	390	400
25	Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp		
	405	410	415
30	Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln		
	420	425	430
35	His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu		
	435	440	445
40	Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser		
	450	455	460
45	Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu		
	465	470	480
50	Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu		
	485	490	495
55	Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro		
	500	505	510
60	Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn		
	515	520	525
65	Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly		
	530	535	540

ES 2 356 066 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620

Thr Tyr Gly Pro Gly Asn Glu Ser Leu Lys Ala Met Leu Phe Cys Leu
625 630 635 640

Phe Lys Leu Ser Ser Cys Asn Gln Ser Asn Asp Gly Ser Val Ser His
645 650 655

Gln Ser Gly Ser Pro Ala Ala Gln Glu Ser Cys Leu Gly Trp Ile Pro
660 665 670

Ser Leu Leu Pro Ser Glu Phe Gln Leu Gly Trp Gly Gly Cys Ser His
675 680 685

Leu His Ala Trp Pro Ser Ala Ser Val Ile Ile Thr Ala Ser Ser Cys
690 695 700

His
705