

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 568**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2006 E 06733637 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1833996**

54 Título: **Procedimientos de pronóstico de cáncer**

30 Prioridad:

06.01.2005 US 642164 P

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

20.03.2013

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

JUBB, ADRIAN, M. y

KOEPPEN, HARTMUT

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 568 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de pronóstico de cáncer.

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La invención se refiere a la detección de polipéptido y/o polinucleótido EphB2 para procedimientos de pronóstico de cáncer colorrectal, y a procedimientos para seleccionar tratamiento contra el cáncer.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El cáncer sigue siendo una de las amenazas más mortíferas para la salud humana. En los EE.UU., el cáncer afecta a casi 1,3 millones de nuevos pacientes cada año, y es la segunda causa principal de muerte después de enfermedad cardíaca, representando aproximadamente 1 de cada 4 muertes. También se predice que el cáncer puede superar a las enfermedades cardiovasculares como la causa número uno de muerte en el plazo de 5 años. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de aquellas muertes. Aunque ha habido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos cánceres, la tasa de supervivencia global a 5 años para todos los cánceres sólo ha mejorado aproximadamente el 10% en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, metastatizan y crecen rápidamente de una forma incontrolada, haciendo extremadamente difícil la detección temprana y el tratamiento. El cáncer colorrectal es la tercera causa más común de mortalidad por cáncer en los Estados Unidos. Se estimó que se diagnosticarían aproximadamente 129.000 nuevos casos de cáncer colorrectal y se producirían 56.000 muertes debido al cáncer colorrectal en los Estados Unidos en 1999 (Landis y col., Cancer J Clin. 49:8-31 (1999)).

[0003] El tratamiento contra el cáncer, tal como quimioterapia, radiación y/o cirugía, tiene riesgos asociados y sería útil poder seleccionar óptimamente los pacientes más probables a beneficiar. La prueba de pronóstico es útil, por ejemplo, para identificar pacientes con males pronósticos de forma que se identificara un enfoque de tratamiento de mayor riesgo más agresivo, y para identificar pacientes con buenos pronósticos para los cuales una terapia arriesgada no proporcionaría suficiente beneficio para garantizar los riesgos. Hay una necesidad urgente de nuevos factores pronósticos en el cáncer.

[0004] Los receptores de Eph constituyen la mayor familia de tirosina cinasas receptoras en el genoma humano e interactúan con ligandos llamados efrinas (revisado en Kullander y col., Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:475-86.). La familia se divide por identidad de secuencias en dos clases, EphA y EphB, con familias de ligando transmembrana correspondientes, denominadas efrinas de tipo A y tipo B. El receptor de EphB2 ("EphB2" o "EphB2R") tiene una región extracelular con un motivo rico en cisteína que se extiende sobre su mitad del extremo amino, seguido de dos motivos de tipo II de fibronectina. Hay un dominio intracelular que caracteriza una región de cinasa conservada y un dominio transmembrana. La expresión de EphB2 se ha descrito en cáncer. Véase, por ejemplo, Cairns y col., WO2003/000113; Mao y col., Cancer Res. 64, 781-788 (2004).

40

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0005] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el pronóstico de cáncer en un sujeto humano diagnosticado con cáncer colorrectal, como se define en las reivindicaciones, comprendiendo el procedimiento: (a) comparar la expresión de EphB2 en una muestra de tejido o célula colorrectal del paciente con la expresión de EphB2 en una muestra de control (valor de referencia de control); y (b) predecir el pronóstico de cáncer del paciente basándose en la comparación en (a), en el que la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a una muestra de control es pronóstica de cáncer en el sujeto. El aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a la muestra de control es pronóstica de cáncer en el sujeto.

50

[0006] Según las reivindicaciones, el pronóstico de cáncer comprende proporcionar la estimación o predicción de (pronóstico de) la duración de la supervivencia de un paciente diagnosticado con un cáncer, o duración de la supervivencia sin reaparición.

[0007] El aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a la muestra de control es pronóstica de duración de la supervivencia prolongada o supervivencia sin reaparición prolongada.

[0008] En otro aspecto, como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona procedimientos para la selección del tratamiento para cáncer colorrectal para un paciente humano, comprendiendo los procedimientos (a) comparar la expresión de EphB2 en una muestra de tejido o célula colorrectal del paciente con la expresión de EphB2 en una muestra de control; (b) predecir el pronóstico de cáncer del paciente basándose en la comparación en (a), en el que la expresión de EphB2 en la muestra elevada del paciente con respecto a una muestra de control es pronóstica de duración elevada de la supervivencia o duración elevada de la supervivencia sin reaparición en el sujeto y (c) posterior a las etapas (a) y (b), seleccionar el tratamiento contra el cáncer para el paciente, en el que la selección del tratamiento se basa en el pronóstico del paciente determinado en la etapa (b). En algunas

65

realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a la muestra de control es pronóstico de cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a la muestra de control es pronóstica de cáncer en el sujeto.

5 **[0009]** También se desvela un procedimiento para la detección de polinucleótido o polipéptido EphB2 en una muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon, comprendiendo el procedimiento comparar la expresión del polinucleótido o polipéptido EphB2 en la muestra biológica con la expresión de EphB2 en una muestra de control. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende células y/o tejido de adenoma de colon.

10

[0010] También se desvela un procedimiento para diagnosticar un trastorno de adenoma de colon, comprendiendo el procedimiento detectar la expresión del polinucleótido o polipéptido EphB2 en la muestra biológica

[0011] procedimiento: para tratar un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB2 (tal como un antagonista de anticuerpo anti-EphB2) al paciente.

15 **[0012]** También se desvela un procedimiento: para tratar un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon administrando una cantidad eficaz de un inmunoconjugado anti-EphB2 al paciente.

20 **[0013]** También se desvela un procedimiento para tratar un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB2, o una cantidad eficaz de un inmunoconjugado anti-EphB2 al paciente, adicionalmente en el que la expresión de EphB2 se detecta en células y/o tejido de adenoma de colon del paciente humano antes, durante o después de la administración de un anticuerpo anti-EphB2 o un inmunoconjugado anti-EphB2. En algunas realizaciones, la expresión en exceso de EphB2 se detecta antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-EphB2 o un inmunoconjugado anti-EphB2. La expresión puede detectarse antes; durante; después; antes y durante; antes y después; durante y después; o antes, durante y después de la administración de un anticuerpo anti-EphB2 o un inmunoconjugado anti-EphB2.

25 **[0014]** En algunas realizaciones, el trastorno de adenoma de colon puede seleccionarse del grupo que consiste en poliposis adenomatosa familiar, síndrome de Peutz-Jegher, síndrome de poliposis juvenil, síndrome de poliposis mixta hereditaria, enfermedad de Cowden y síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley.

35

[0015] En realizaciones que implican la selección del tratamiento contra el cáncer o selección del tratamiento contra el trastorno de adenoma de colon, el tratamiento contra el cáncer o tratamiento contra el trastorno de adenoma de colon puede comprender administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EphB2, o una cantidad eficaz de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-EphB2. En otras realizaciones más, el tratamiento comprende una cualquiera o más de quimioterapia, radiación y cirugía.

40 **[0016]** En algunas realizaciones que implican la administración de anticuerpos, el anticuerpo anti-EphB2 está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606 (depositado el 24 de febrero de 2005). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es un anticuerpo que comprende dominio(s) variable(s) de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a EphB2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 comprende al menos una (al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 y/o 6) secuencia(s) hipervariable(s) (HVR(s)) que comprende(n) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y/o HVR-H3 del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a EphB2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es un anticuerpo que se une al mismo epítoto sobre EphB2 humano como el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es un anticuerpo que compite con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606 por unirse a EphB2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 comprende: al menos una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis secuencias de regiones hipervariables (HVR) seleccionada(s) del grupo que consiste en: (a) HVR-L1 que comprende la secuencia KSSQSLNLSGNQENYLA (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-L2 que comprende la secuencia GASTRES (SEQ ID NO:2); (c) HVR-L3 que comprende la secuencia QNDHSTYPT (SEQ ID NO:3); (d) HVR-H1 que comprende la secuencia SYWMH (SEQ ID NO:4); (e) HVR-H2 que comprende la secuencia FINPSTGYTDYNQKFKD (SEQ ID NO:5); y (f) HVR-H3 que comprende la secuencia RLKLLRYAMDY (SEQ ID NO:6). En una realización, el anticuerpo anti-EphB2 comprende un dominio variable de la cadena ligera que tiene la

65

secuencia:

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMNCKSSQSLNLSGNQENYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRF

TGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCQNDHSYPFTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:7). En una realización, el anticuerpo anti-EphB2 comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGFINPSTGYTDYNQKFKD

KATLTVKSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCTRRLKLLRYAMDYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:8). En una realización, el anticuerpo anti-EphB2 comprende un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia:

10 DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMNCKSSQSLNLSGNQENYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRF

TGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCQNDHSYPFTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:7); y comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGFINPSTGYTDYNQKFKD

KATLTVKSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCTRRLKLLRYAMDYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:8).

15

[0017] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado anti-EphB2 comprende además una toxina, un agente para quimioterapia, un agente inhibidor del crecimiento o material radiactivo. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un maitansinoide. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende MMAE.

20 **[0018]** En realizaciones que implican la detección de la expresión de EphB2 puede detectarse la expresión del polinucleótido EphB2 y/o la expresión del polipéptido EphB2. En realizaciones que implican la detección de la expresión de EphB2 se detecta la expresión de ARNm de EphB2. En otras realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se detecta usando un agente anti-EphB2. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se detecta usando un anticuerpo. Cualquier anticuerpo adecuado puede usarse para la detección, que incluye anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y/o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se detecta usando inmunohistoquímica (IHC). En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 se puntúa en 2 o superior usando IHC. En algunas realizaciones se detecta una variante de EphB2 y/o fragmento. En algunas realizaciones, el polipéptido de variante tiene al menos aproximadamente el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias de aminoácidos con un polipéptido de secuencia nativa, en algunas realizaciones, el polipéptido mostrado en las Figuras 1, 3 y/o 5. En otras realizaciones, el polipéptido de variante está codificado por una secuencia de polinucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con una secuencia de polinucleótidos EphB2, en algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótidos mostradas en las Figuras 2, 4 y/o 6. En algunas realizaciones, el polinucleótido de variante tiene al menos aproximadamente el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias de polinucleótidos con un polinucleótido de secuencia nativa, en algunas realizaciones, el polinucleótido mostrado en las Figuras 2, 4 y/o 6. En otras realizaciones, el polinucleótido de variante comprende una secuencia de polinucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con una secuencia de polinucleótidos EphB2, en algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótidos mostradas en las Figuras 1, 3 y/o 5. En algunas realizaciones, las variantes de EphB2 son biológicamente activas. Las actividades biológicas de EphB2 son muy conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, una cualquiera o más de las siguientes: (a) se unen a ligando(s) de EphB2 (tales como efrina-B1, efrina-B2, efrina-B3 y/o efrina-A4); (b) se unen a ligando de EphB2 y activan la actividad biológica de ligandos de EphB2 o rutas en la dirección 3' mediadas por ligando de EphB2; (c) señalizan en respuesta a la unión a ligando de EphB2.

45

[0019] En algunas realizaciones que implican la detección de la expresión de EphB2, la presencia y/o ausencia y/o nivel de expresión de EphB2 puede detectarse. La expresión de EphB2 puede aumentarse. Se entiende que la ausencia de expresión de EphB2 incluye niveles insignificantes o de mínimos. En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 en la muestra biológica de prueba es superior a la observada para una muestra de control biológica (o nivel de expresión de control). En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces superior o superior en la muestra biológica de prueba que en la muestra de control biológica. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se determina en un ensayo de inmunohistoquímica ("IHC") para puntuar al menos 2 o superior para intensidad de tinción. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se determina en un ensayo de IHC para puntuar al menos 1 o superior, o al menos 3 o superior para intensidad de tinción. En algunas realizaciones, en la muestra biológica de prueba es inferior a la observada para una muestra de control biológica (o nivel de expresión de control). En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces inferior o inferior en la muestra biológica de prueba que en la muestra de control biológica.

60

[0020] En algunas realizaciones que implican detección, los procedimientos comprenden además la detección de la expresión de uno o más ligandos de EphB2.

[0021] También se desvelan kits, composiciones y artículos de fabricación que comprenden polinucleótido(s) y/o polipéptido(s) EphB2 y/o inmunocombinados anti-EphB2. En algunas realizaciones, los kits y artículos de fabricación comprenden además instrucciones para cualquier procedimiento desvelado en el presente documento.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0022]

FIGURA 1: representa la secuencia de aminoácidos predicha de la variante de transcrito de EphB2 1 (nº de acceso de GenBank NM_017449) (SEQ ID NO:9).

FIGURAS 2A y 2B: representan la secuencia de ADNc de la variante de transcrito de EphB2 1 (nº de acceso de GenBank NM_017449) (SEQ ID NO: 10).

FIGURA 3: representa la secuencia de aminoácidos predicha de la variante de transcrito de EphB2 2 (nº de acceso de GenBank NM_004442) (SEQ ID NO: 11).

FIGURAS 4A y 4B: representan la secuencia de ADNc de la variante de transcrito de EphB2 2 (nº de acceso de GenBank NM_004442) (SEQ ID NO: 12).

FIGURA 5: representa la secuencia de aminoácidos predicha de EphB2 desvelada en la Figura 101 del documento WO03/000113 (SEQ ID NO: 13).

FIGURA 6: representa la secuencia de ADNc de EphB2 desvelada en la Figura 23 del documento WO03/000113 (SEQ ID NO:14).

FIGURA 7: representa la expresión de ARNm de EphB2 (indistintamente llamado "EphB2") en tejidos completos que representan desarrollo de tumor colorrectal (A), epitelio microdisecionado de colon normal y cánceres primarios (B) (obtenidos de Gene Logic), y líneas celulares de tumor colorrectal (C). La expresión de EphB2 se representa como la intensidad de señal media (intervalos de confianza de +/- 95%) del conjunto de sondas 209588_at en la matriz de sondas Affymetrix HG-U133 de GeneChip. Las líneas celulares se agrupan según su puntuación de intensidad de inmunohistoquímica (IHC) de EphB2.

FIGURA 8: EphB2 se expresa en la base de criptas colónicas normales (A) y en todos los estados de tumorigénesis colorrectal, que incluyen criptas adenomatosas (B izquierda superior, criptas normales adyacentes derecha inferior), cánceres primarios (C), metástasis de ganglios linfáticos (D), metástasis mesentéricas (E) y metástasis hepáticas (F). La localización de EphB2 membranoso y citoplásmico se muestra por deposición del cromógeno DAB (marrón) contra una contratinción con hematoxilina (azul).

FIGURA 9: muestra la expresión de EphB2 por inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* (HIS) en colon normal y cánceres colorrectales. Se muestran cánceres primarios representativos con puntuaciones inmunohistoquímicas de cero, uno y dos. La deposición del cromógeno DAB (marrón) membranoso y citoplásmico, que ilustra la expresión de EphB2, se observa sobre células de colon normal y neoplásicas contra una contratinción con hematoxilina (azul). Imágenes de campo brillante (teñidas con hematoxilina y eosina) y de HIS de campo oscuro correspondientes demuestran un patrón idéntico de expresión de EphB2 limitada a epitelio, mostrada por la deposición de granos de plata en el campo de oscuridad. Barra = 100 µm.

FIGURA 10: representa la frecuencia de expresión de EphB2 en adenomas colorrectales (MMT, n = 148) y una serie de cánceres primarios (sección completa, n = 28) y metástasis (sección completa, n = 39).

FIGURA 11: representa representaciones de Kaplan-Meier que demuestran la supervivencia global (A) y la supervivencia sin reaparición (B) para subgrupos de pacientes con CCR con alta expresión de EphB2 (puntuación 2) o baja expresión de EphB2 (puntuación 0 ó 1). Las razones de riesgo para la alta expresión de EphB2 fueron 0,45, intervalos de confianza del 95% (IC) 0,18-0,95, para supervivencia global, y 0,60, IC 0,30-1,10, para la supervivencia sin reaparición. La línea discontinua en (A) y (B) representa la puntuación de EphB2 0, 1; y la línea continua en (A) y (B) representa la puntuación de EphB2 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0023] En el presente documento se desvelan procedimientos para detectar un polipéptido(s) (por ejemplo, EphB2) en una muestra biológica de un sujeto, tal como un sujeto humano. Según la invención, los solicitantes encontraron sorprendentemente que la expresión de EphB2 era predictiva de cáncer pronóstico. Por tanto, los procedimientos desvelados pueden proporcionar medios convenientes, eficientes y posiblemente rentables para obtener datos e información útil en la evaluación de la futura evolución del trastorno, que incluye selección de terapias apropiadas para tratar pacientes.

[0024] En otro aspecto, la invención también proporciona procedimientos para la selección del tratamiento contra el cáncer. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende la administración de una cantidad eficaz de un agente anti-EphB2 (tal como un anticuerpo), o una cantidad eficaz de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-EphB2 conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina activa de origen sintético, bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0025] También se desvelan procedimientos para detectar la expresión de EphB2 en paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon, procedimientos para diagnosticar un trastorno de adenoma de colon y procedimientos para tratar trastornos de cáncer de colon.

[0026] También se desvelan kits, composiciones y artículos de fabricación.

15 **TÉCNICAS GENERALES**

[0027] Las técnicas y procedimientos descritos o citados en el presente documento son generalmente muy entendidas y comúnmente empleadas usando metodología convencional por aquellos expertos en la materia tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, y col. eds., (2003)); la serie *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, AND ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis y col., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan y col., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita y col., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

DEFINICIONES

[0028] Como se usa en el presente documento, “EphB2” (indistintamente llamado “EphB2R”) se define como todas las especies de mamífero del receptor de Eph B2 de secuencia nativa, incluyendo el receptor de Eph B2 humano. El término “secuencia nativa” a propósito de EphB2 o cualquier otro polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido correspondiente derivado de la naturaleza, independientemente de su modo de preparación. Tal polipéptido de la secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes y/o sintéticos o cualquier combinación de los mismos. El término “secuencia nativa” engloba específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variante que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas que se producen naturalmente. Como se usa en el presente documento, “EphB2” se refiere a la expresión de proteínas y/o polipéptidos. Generalmente, el término se refiere a la expresión de tanto polipéptido como polinucleótido. Sin embargo, el contexto puede indicar que la referencia está prevista para o bien polipéptido o bien polinucleótido.

[0029] El término “dominio extracelular de EphB2” o “ECD de EphB2” se refiere a una forma de EphB2 que está esencialmente libre de dominios transmembrana y citoplásmicos. Generalmente, el ECD tendrá menos del 1% de tales dominios transmembrana y citoplásmicos, y preferentemente tendrá menos del 0,5% de tales dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos de la presente invención se identifica conforme a criterios rutinariamente empleados en la materia para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probablemente no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio que se ha identificado inicialmente. En realizaciones preferidas, el ECD consistirá en una secuencia del dominio extracelular soluble del polipéptido que está libre de los dominios transmembrana y citoplásmicos o intracelulares (y no está unido a la membrana).

[0030] Como se usa en el presente documento, el término “ligando de EphB2” incluye todas las especies de mamífero del ligando de EphB2 de secuencia nativa, que incluye todas las especies de mamífero de efrina-B1, efrina-B2, efrina-B3 y efrina-A4 de secuencia nativa. Como se usa en el presente documento, “ligando de EphB2” se

refiere a la expresión de proteína y/o polipéptido. Generalmente, el término se refiere a la expresión de tanto polipéptido como polinucleótido. Sin embargo, el contexto puede indicar que la referencia está prevista para o bien polipéptido o bien polinucleótido.

5 **[0031]** “Pronóstico de cáncer” se refiere generalmente a una estimación o predicción de la probable evolución o desenlace del cáncer. Como se usa en el presente documento, el pronóstico de cáncer incluye la estimación o predicción de una cualquiera o más de las siguientes: duración de la supervivencia de un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer, duración de la supervivencia sin reaparición, duración de la supervivencia libre de progresión de un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer, tasa de respuesta en un grupo de pacientes
10 susceptible a o diagnosticado con un cáncer, duración de la respuesta en un paciente o un grupo de pacientes susceptible a o diagnosticado con un cáncer y/o probabilidad de metástasis en un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer. Como se usa en el presente documento, “pronóstico de cáncer” significa proporcionar una estimación o predicción de la probable evolución o desenlace del cáncer. En algunas realizaciones, “pronóstico para cáncer” comprende proporcionar la estimación o predicción de (pronóstico de) una cualquiera o más de las
15 siguientes: duración de la supervivencia de un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer, duración de la supervivencia sin reaparición, duración de la supervivencia libre de progresión de un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer, tasa de respuesta en un grupo de pacientes susceptible a o diagnosticado con un cáncer, duración de la respuesta en un paciente o un grupo de pacientes susceptible a o diagnosticado con un cáncer y/o probabilidad de metástasis en un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer.

20 **[0032]** Por “sujeto” o “paciente” se indica cualquier sujeto individual para el que se desea terapia, que incluye seres humanos, ganado vacuno, perros, cobayas, conejos, pollos, etc. También está previsto incluir como sujeto cualquier sujeto que participe en ensayos de investigación clínica que no muestren ningún signo clínico de enfermedad, o sujetos que participan en estudios epidemiológicos, o sujetos usados como controles.

25 **[0033]** El término “mamífero” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, que incluye seres humanos, vacas, caballos, perros y gatos.

[0034] Una “muestra biológica” (indistintamente llamada “muestra” o “muestra de tejido o célula”) engloba una
30 variedad de tipos de muestra obtenidos de un individuo y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o monitorización. La definición engloba sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras sólidas de tejido tal como un espécimen de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de los mismos, y la progenie de los mismos. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de cualquier modo después de su obtención tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes
35 tales como proteínas o polinucleótidos, o incorporación en una matriz semisólida o sólida para fines de seccionamiento. El término “muestra biológica” engloba una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados celulares, suero, plasma, líquido biológico y muestras de tejido. La fuente de la muestra biológica puede ser tejido sólido como de un órgano fresco, congelado y/o preservado o muestra de tejido o biopsia o aspirado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales tales como líquido
40 cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento en la gestación o desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra biológica puede contener compuestos que no se entremezclan naturalmente con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, taponnes, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

45 **[0035]** Para los fines en el presente documento, una “sección” de una muestra de tejido indica una única parte o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo, una delgada rebanada de tejido o células cortadas de una muestra de tejido. Se entiende que pueden tomarse múltiples secciones de muestras de tejido y someterse a análisis según la presente invención. En algunas realizaciones, la misma sección de muestra de tejido se analiza a niveles tanto
50 morfológicos como moleculares, o se analiza con respecto a tanto proteína como ácido nucleico.

[0036] “Polinucleótido” o “ácido nucleico,” como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos
55 modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “tapas”, sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen naturalmente con un análogo,
60 modificaciones entre nucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, cabamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleases, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro,
65 metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos

nucleicos alfa anoméricos, etc.), además de formas sin modificar del (de los) polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presentes en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos. Los OH del extremo 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de remate orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metilribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato está sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditiato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal") en las que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o sin sustituir (1-20 C) que opcionalmente contiene un enlace éter (--O--), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos citados en el presente documento, que incluyen ARN y ADN.

[0037] Por "gen" se indica cualquier secuencia de polinucleótidos o porción de la misma con una función funcional en codificar o transcribir una proteína o regular otra expresión génica. El gen puede consistir en todos los ácidos nucleicos responsables de codificar una proteína funcional o sólo una parte de los ácidos nucleicos responsables de codificar o expresar una proteína. La secuencia de polinucleótidos puede contener una anomalía genética dentro de exones, intrones, regiones de iniciación o terminación, secuencias promotoras, otras secuencias reguladoras o regiones adyacentes únicas al gen.

[0038] La palabra "marca" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que está conjugado o fusionado directamente o indirectamente con un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo con el que está conjugado o fusionado. La marca puede ser por sí misma detectable (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

[0039] El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos.

[0040] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencien ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usen en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida por todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman la región estructural (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de hoja β , conectados por tres CDR que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0041] "Fragmentos de anticuerpos" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, que incluye generalmente un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, que retiene la capacidad para unirse a antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos englobados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene los dominios VL, CL, VH y CH₁; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH₁; (iii) el fragmento Fd que tiene los dominios VH y CH₁; (iv) el fragmento Fd' que tiene los dominios VH y CH₁ y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH₁; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward y col., *Nature* 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, Fv monocatenario; scFv) (Bird y col., *Science* 242:423-426 (1988); y Huston y col., *PNAS (USA)* 85:5879-5883 (1988)); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (véanse, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par

de fragmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de la cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata y col. *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995); y patente de EE.UU. nº 5.641.870).

5 **[0042]** El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos
10 policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. El modificador “monoclonal” no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature* 256:495
15 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col., *Nature* 352:624-628 (1991) o Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

20 **[0043]** Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de
25 anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

[0044] Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados
30 son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región hipervariable del receptor están sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no
35 se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también
40 comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones y col., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

[0045] El término “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, cuando se usan en el presente documento, se refiere a
45 las regiones de un dominio variable de anticuerpos que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Están en uso varias delineaciones de regiones hipervariables y están englobadas en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencias y son las más comúnmente usadas (Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological*
50 *Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables del AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM. Las regiones hipervariables de “contacto” se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles.

55 **[0046]** Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los
60 anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano está seleccionado de una biblioteca de fagos, en el que esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col. *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets y col. *PNAS (USA)* 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales
65 transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcialmente o

completamente inactivados. Tras la exposición se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, que incluye transposición de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante immortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991); y patente de EE.UU. nº 5.750.373.

[0047] Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que resultan de una mejora en la afinidad del anticuerpo por antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee aquella(s) alteración (alteraciones). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de CDR y/o residuos de la región estructural se describe por: Barbas y col. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier y col. Gene 169:147-155 (1995); Yelton y col. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y col., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

[0048] Un anticuerpo "que se une" a antígeno de interés es uno que puede unirse a ese antígeno con suficiente afinidad y/o aidez de forma que el anticuerpo sea útil como pronóstico y/o detección (tal como diagnóstico) y/o agente terapéutico para el antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo "que se une" a antígeno de interés se une específicamente o preferencialmente al antígeno de interés. En algunas realizaciones, el anticuerpo "que se une" a antígeno de interés se une exclusivamente al antígeno de interés.

[0049] Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el antagonista o anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso de anticuerpo como se ha determinado por el procedimiento de Lowry, y lo más preferentemente a más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo N o secuencia de aminoácidos interna por el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

[0050] Una "variante" de polipéptido significa un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que el uno o más residuos de aminoácidos se añaden, o delecionan, en el extremo N o C del polipéptido. Generalmente, una variante tendrá al menos aproximadamente el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa.

[0051] Una "variante" de polinucleótido significa un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de polinucleótidos con el polinucleótido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polinucleótidos en los que el uno o más nucleótidos se añaden, o delecionan, en el extremo 5' o 3' del polinucleótido. Generalmente, una variante tendrá al menos aproximadamente el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias con el polinucleótido de secuencia nativa.

[0052] Un "fragmento" de polipéptido (también llamado una "región") es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950 o más aminoácidos contiguos de una secuencia de polipéptidos.

[0053] Un "fragmento" de polinucleótido (también llamado una "región") es un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500,

750, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 3400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de polinucleótidos.

5 **[0054]** Los términos “cáncer”, “canceroso” o “maligno” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma y cáncer de mama.

10

[0055] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y preferentemente parar) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, 15 ralentizar a cierto grado y preferentemente parar) metástasis tumorales; inhibir, a cierto grado, crecimiento tumoral; y/o aliviar a cierto grado uno o más de los síntomas asociados al trastorno. Hasta el punto de que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para terapia contra el cáncer, la eficacia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse evaluando la duración de la supervivencia, tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), duración de la respuesta y/o calidad de 20 vida. En el caso de adenoma de colon, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir, por ejemplo, el número de células de adenoma; reducir el tamaño del adenoma; reducir el número de adenomas; inhibir, a cierto grado, el crecimiento de adenomas; y/o aliviar a cierto grado uno o más de los síntomas asociados al trastorno.

[0056] Como se usa en el presente documento, “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados clínicos 25 beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y/o parar) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y/o parar) metástasis tumorales; inhibir, a cierto grado, crecimiento tumoral; y/o aliviar a cierto grado uno o más de los síntomas asociados al trastorno, encoger el tamaño 30 del tumor, disminuir los síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, disminuir la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad y/o prolongar la supervivencia de pacientes.

[0057] “Aislado,” cuando se usa para describir los diversos polipéptidos o proteínas desvelados en el presente 35 documento, significa polipéptido o proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su natural entorno. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido o proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido o proteína se purificará (1) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo N o secuencia de aminoácidos 40 interna usando un secuenciador de taza giratoria, o (2) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata, o (3) a homogeneidad en técnicas espectroscópicas de masa o de mapeo de péptidos. El material aislado incluye polipéptido o proteína *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente de su entorno natural no estará presente. Generalmente, sin embargo, el polipéptido o proteína aislado se preparará por al menos una etapa de purificación. 45

[0058] Los términos “polipéptido”, “oligopéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos 50 también engloban un polímero de aminoácido que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación tal como conjugación con un componente de marcado. También están incluidos dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), además de otras modificaciones conocidas en la técnica.

[0059] El “porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos” con respecto a las secuencias 55 identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento para 60 los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento que incluye asignar algoritmos necesarios para lograr el máximo alineamiento con respecto a las secuencias de longitud completa que se comparan. Para los fines en el presente documento, los valores de porcentaje de identidad de aminoácidos pueden obtenerse usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, que fue 65 escrito por Genentech, Inc. y cuyo código fuente ha sido presentado con documentación de usuario en la Oficina de

derechos de autor estadounidense, Washington, DC, 20559, registrado bajo el n° de registro de derechos de autor estadounidense TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

5

[0060] “Porcentaje (%) de identidad de secuencias de ácidos nucleicos” se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de referencia de interés, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los fines en el presente documento, los valores de % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

15

[0061] La “rigurosidad” de reacciones de hibridación es fácilmente determinable por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de sonda, temperatura de lavado y concentración de sales. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para la hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para volver a hibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de identidad deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, de esto resulta que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas menores menos rigurosas. Para detalles adicionales y explicación de la rigurosidad de reacciones de hibridación véase Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (2003).

25

[0062] “Condiciones de alta rigurosidad”, como se define en el presente documento, se identifican por aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado; cloruro sódico 0,015 M / citrato de sodio 0,0015 M / dodecilsulfato de sodio 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante; 50% (v/v) de formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

30

35

[0063] “Condiciones moderadamente rigurosas” pueden identificarse como se describe por Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende: 20% de formamida, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de sonda y similares.

40

[0064] La “detección” incluye cualquier medio de detección, que incluye detección directa e indirecta. Por ejemplo, productos “detectablemente menores” pueden observarse directamente o indirectamente, y el término indica cualquier reducción (incluyendo sin productos). Similarmente, producto “detectablemente más” significa cualquier aumento, si se observa directamente o indirectamente.

45

50 “Que comprende” significa que incluye.

[0065] Como se usa en el presente documento, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, referencia a “una alteración genética” incluye una pluralidad de tales alteraciones y referencia a “una sonda” incluye referencia a una o más sondas.

55

[0066] El término “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término está previsto que incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, mefalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o contra el cáncer desvelados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida produce la destrucción de

60

65

células tumorales.

[0067] Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; 5 alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapacol; colcicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, 10 CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calmentestatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiastatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, 15 clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, ftofamidina, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y la cromoproteína relacionada cromóforos antibióticos de enediína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, 20 azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, 25 peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, 30 propanato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxirena; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; 35 nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, 40 Princeton, N.J.), formulación de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel sin Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); 45 novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; además de combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) 50 combinado con 5-FU y leucovovina.

[0068] En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer, y están frecuentemente en forma de tratamiento sistémico, o de cuerpo completo. Pueden ser las propias hormonas. Ejemplos incluyen 55 antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); agentes que funcionan para suprimir o cerrar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida 60 LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos 65 incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-

58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; además de troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de moléculas pequeñas de tirosina cinasa dual ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

10

[0069] Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa EphB2) bien *in vitro* o bien *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa EphB2) en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos previniendo la despolimerización, que produce la inhibición de la mitosis en células.

[0070] “Doxorubicina” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-a-L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

30

PROCEDIMIENTOS DE LA INVENCION

Procedimientos que comprenden detección de EphB2

35

[0071] En un aspecto, la invención proporciona procedimientos que comprenden la detección de polipéptido(s) y/o polinucleótido(s) EphB2 en una muestra de tejido o célula colorrectal de un paciente que tiene cáncer colorrectal, en el que la detección es predictiva o indicativa de pronóstico de cáncer en el paciente. Los solicitantes encontraron sorprendentemente que la expresión de EphB2 es predictiva de pronóstico de cáncer. Por tanto, los procedimientos desvelados pueden proporcionar medios convenientes, eficientes y posiblemente rentables para obtener datos e información útil en la evaluación de la futura evolución del trastorno, que incluye selección de terapias apropiadas para tratar pacientes.

[0072] Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona procedimientos para la evaluación del pronóstico de un paciente que tiene cáncer colorrectal, comprendiendo los procedimientos: (a) comparar la expresión de EphB2 en una muestra biológica derivada de cáncer del paciente con la expresión de EphB2 en una muestra de control (o valor de referencia de control); y (b) predecir el pronóstico de cáncer del paciente basándose en la comparación en (a), en el que la expresión de EphB2 es pronóstica de cáncer colorrectal en el paciente. En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a la muestra de control (o valor de referencia de control) es pronóstica de cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a la muestra de control (o valor de referencia de control) es pronóstica de cáncer en el sujeto.

[0073] En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para la evaluación del pronóstico de un paciente que tiene cáncer colorrectal, comprendiendo los procedimientos: (a) obtener una muestra de tejido o célula colorrectal del paciente; y (b) detectar la expresión de EphB2 en la muestra, en el que la expresión de EphB2 es pronóstica de cáncer colorrectal en el paciente. En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a una muestra de control (o un valor de referencia de control) es pronóstico de cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a la muestra de control (o valor de referencia de control) es pronóstica de cáncer en el sujeto.

[0074] El cáncer es cáncer colorrectal. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de colon posiblemente curable por cirugía. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de colon inoperable. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de colon metastásico.

65

[0075] Generalmente, como se usa en el presente documento, el pronóstico de cáncer engloba la estimación o predicción de una cualquiera o más de las siguientes: duración de la supervivencia de un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer, duración de la supervivencia sin reaparición, duración de la supervivencia libre de progresión de un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer, tasa de respuesta en un grupo de pacientes susceptible a o diagnosticado con un cáncer, duración de la respuesta en un paciente o un grupo de pacientes susceptible a o diagnosticado con un cáncer y/o probabilidad de metástasis en un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer. La duración de la supervivencia se define como el tiempo desde la primera administración del tratamiento hasta la muerte. La duración de la supervivencia también puede medirse por la razón de riesgo estratificada (HR) del grupo de tratamiento frente al grupo de control, que representa el riesgo de muerte para un paciente durante el tratamiento. La duración de la supervivencia sin reaparición se define como el tiempo desde el tratamiento hasta la reaparición del cáncer. El tiempo hasta la progresión de la enfermedad se define como el tiempo desde la administración del tratamiento hasta la progresión de la enfermedad. La tasa de respuesta se define como el porcentaje de pacientes tratados que respondieron al tratamiento. La duración de la respuesta se define como el tiempo desde la respuesta inicial a tratamiento hasta la progresión de la enfermedad. En algunas realizaciones, la duración de la supervivencia y la duración de la supervivencia libre de progresión se predicen. En algunas realizaciones, el pronóstico define el desenlace en ausencia de terapia adyuvante.

[0076] En alguna realización, el pronóstico para cáncer comprende proporcionar la estimación o predicción de una cualquiera o más de las siguientes: duración de la supervivencia de un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer, duración de la supervivencia sin reaparición, duración de la supervivencia libre de progresión de un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer, tasa de respuesta en un grupo de pacientes susceptible a o diagnosticado con un cáncer, duración de la respuesta en un paciente o un grupo de pacientes susceptible a o diagnosticado con un cáncer y/o probabilidad de metástasis en un paciente susceptible a o diagnosticado con un cáncer. En algunas realizaciones, la duración de la supervivencia se pronostica o se predice que aumenta. En alguna realización, la duración de la supervivencia se pronostica o se predice que disminuye. En algunas realizaciones, la duración de la supervivencia sin reaparición se pronostica o se predice que aumenta. En alguna realización, la duración de la supervivencia sin reaparición se pronostica o se predice que disminuye. En algunas realizaciones, la tasa de respuesta se pronostica o se predice que aumenta. En algunas realizaciones, la tasa de respuesta se pronostica o se predice que disminuye. En algunas realizaciones, la duración de la respuesta es predicha o se predice que aumenta. En algunas realizaciones, la probabilidad de metástasis se predice o se pronostica que aumenta. En algunas realizaciones, la probabilidad de metástasis se predice o se pronostica que disminuye. En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a la muestra de control es pronóstica de duración de la supervivencia prolongada. En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a la muestra de control es pronóstica de supervivencia sin reaparición prolongada.

[0077] Se entiende que otros factores de pronóstico y/o diagnóstico pueden considerarse además de y/o en combinación (conjunción) con la expresión de EphB2. Factores de pronóstico y/o diagnóstico a modo de ejemplo incluyen edad y/o sexo del paciente, estadio de TNM (TNM Classification of Malignant Tumours, sexta ed.), grado de tumor, presencia o ausencia de invasión linfática, presencia o ausencia de invasión de vasos sanguíneos y sitio. Para cáncer colorrectal, el sitio puede ser uno o más del ciego, colon ascendente y transverso, colon descendente y sigmoide, o recto. Véanse también Nicum y col., Acta Oncol 42:263-275 (2003); Kinzler, KW, y Vogelstein, B. Colorectal Tumors, en Kinzler KW, Vogelstein B, eds. The Genetic Basis of Human Cancer: McGraw-Hill 1999, pág. 565-87. La participación maligna del margen de resección circunferencial quirúrgica es un factor de pronóstico fuerte para la supervivencia del paciente en cáncer rectal. Véase ídem; Birbeck y col. Annals Surg 235:449-457 (2002). Factores adicionales que pueden considerarse generalmente se conocen en la técnica e incluyen evolución previa del tratamiento del paciente que incluye cirugía, tratamiento con radiación, quimioterapia y tratamiento con otros fármacos.

[0078] EphB2 es muy conocido en la técnica. Secuencias de polinucleótidos y aminoácidos de EphB2 a modo de ejemplo se representan en las Figuras 1-6. Las secuencias de EphB2 a modo de ejemplo se desvelan adicionalmente en, por ejemplo, Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); documentos WO2003042661; WO200053216; WO2004065576; WO2004020583; WO2003004529 (página 128-132); y WO200053216. Como se usa en el presente documento, EphB2 engloba formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variante que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas que se producen naturalmente de los polipéptidos de longitud completa.

[0079] Los procedimientos de la invención también pueden detectar polipéptido(s) y/o polinucleótidos de variante EphB2. En algunas realizaciones, el polipéptido de variante tiene al menos aproximadamente el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias de aminoácidos con un polipéptido de secuencia nativa, en algunas realizaciones, el polipéptido mostrado en las Figuras 1, 3 y/o 5. En otras realizaciones, el polipéptido de variante está codificada por

una secuencia de polinucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con una secuencia de polinucleótidos de EphB2, en algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótidos mostradas en las Figuras 2, 4 y/o 6. En algunas realizaciones, la polinucleótido de variante tiene al menos aproximadamente el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% identidad de secuencias de polinucleótidos con un polinucleótido de secuencia nativa, en algunas realizaciones, el polinucleótido mostrado en las Figuras 2, 4 y/o 6. En otras realizaciones, la polinucleótido de variante comprende una secuencia de polinucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con una secuencia de polinucleótidos de EphB2, en algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótidos mostradas en las Figuras 1, 3 y/o 5. En algunas realizaciones, las variantes de EphB2 son biológicamente activas. Las actividades biológicas de EphB2 son muy conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, una cualquiera o más de las siguientes: (a) se unen a ligando(s) de EphB2 (tales como efrina-B1, efrina-B2, efrina-B3 y/o efrina-A4); (b) se unen a ligando de EphB2 y activan la actividad biológica de ligandos de EphB2 o rutas en la dirección 3' mediadas por ligando de EphB2; (c) señalizan en respuesta a la unión a ligando de EphB2. Los procedimientos de la invención también pueden detectar fragmentos de EphB2.

15 **[0080]** La detección de la expresión puede ser cuantitativa o cualitativa. La presencia y/o ausencia y/o nivel (cantidad) de expresión de EphB2 puede detectarse. Se entiende que la ausencia de expresión de EphB2 incluye niveles insignificantes, o de mínimos. La expresión del polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en la muestra biológica de prueba puede ser superior a la observada para una muestra de control biológica (o valor de referencia de control) (llamado "expresión en exceso). En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces superior o superior en la muestra biológica de prueba. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se determina en un ensayo de inmunohistoquímica ("IHC") para puntuar al menos 2 o superior para intensidad de tinción. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se determina en un ensayo IHC para puntuar al menos 1 o superior o al menos 3 o superior para intensidad de tinción. La expresión de polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en la muestra biológica de prueba puede ser inferior a la observada para una muestra de control biológica (llamada "expresión por defecto"). En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces inferior o inferior en la muestra biológica de prueba.

30 **[0081]** La expresión de EphB2 en la muestra biológica de prueba (es decir, la muestra biológica del paciente que tiene cáncer o del que se sospecha que tiene cáncer) puede compararse con una muestra de control adecuada, como es muy conocido en la técnica. Controles a modo de ejemplo incluyen muestras normales comparables (por ejemplo, tejido no canceroso normal o células del mismo tipo que las presentes en la muestra biológica de prueba), muestras normales de correspondencia del mismo paciente, muestras de control universales o un valor de referencia normal (también llamado un valor de referencia de control). Como se usa en el presente documento, el término "control" o "muestra de control" engloba un valor de referencia normal. Los procedimientos para la comparación de niveles de expresión (tal como presencia o ausencia de o cantidad de expresión) se conocen en la técnica, y algunos se describen y ejemplifican en el presente documento.

40 **[0082]** Como se trata en el presente documento, EphB2 en una muestra biológica puede detectarse por varios procedimientos que son muy conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, análisis inmunohistoquímicos y/o Western, ensayos de actividad enzimática bioquímica, hibridación *in situ*, análisis Northern y/o análisis por PCR de ARNm y análisis Southern genómicos (para examinar, por ejemplo, delección o amplificación de genes), además de una cualquiera de la amplia variedad de ensayos que pueden realizarse por análisis de matrices de genes, proteínas y/o tejidos. Protocolos típicos para evaluar el estado de polinucleótidos y polipéptidos se encuentran, por ejemplo en Ausubel y col. eds., 2003, y algunos se describen y ejemplifican en el presente documento.

50 **Detección del polipéptido EphB2**

[0083] En el presente documento se desvelan procedimientos para detectar (por ejemplo, presencia o ausencia de o cantidad de) un polipéptido(s) (por ejemplo, EphB2) en una muestra biológica de un sujeto, tal como un sujeto humano. Puede emplearse una variedad de procedimientos para detectar polipéptidos e incluyen, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico, inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), espectroscopía de masas, micromatriz de proteínas y similares.

60 **[0084]** En algunas realizaciones, EphB2 en una muestra biológica se detecta (a) poniendo en contacto la muestra con un agente de unión de EphB2 tal como un anticuerpo, un fragmento del mismo o una proteína (tal como una proteína recombinante) que contiene una región de unión a EphB2; y (b) detectando el complejo agente de unión de EphB2-polipéptido EphB2 en la muestra.

[0085] En la técnica se conocen anticuerpos anti-EphB2 (por ejemplo, número de catálogo AF467, R&D Systems, Mineápolis, MN) y pueden generarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Un anticuerpo

anti-EphB2 debe presentar una cualquiera o más de las siguientes características (ensayos para los que son muy conocidos en la técnica): (a) se unen a EphB2; (b) bloquean o disminuyen la activación de EphB2; (c) bloquean o disminuyen la activación y/o unión a ligando de EphB2 (tal como efrinas-B1, efrinas-B2, efrinas-B3 y/o efrinas-A4)). Un ensayo para la activación de EphB2 se describe en Mao y col. Cancer Res. 64: 781-788, 2004. Anticuerpos anti-EphB2 a modo de ejemplo adicionales se describen en el presente documento.

[0086] El anticuerpo anti-EphB2 puede unirse, preferencialmente se une a o exclusivamente se une, a EphB2. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a EphB2 y no reacciona significativamente de forma cruzada con EphB 1R y/o EphB3R. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 se une a EphB2 y no reacciona significativamente de forma cruzada con EphB1R, EphB3R, EphB4R, EphB5R y/o EphB6R. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 se une a un fragmento del polipéptido EphB2 que comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940 o más aminoácidos contiguos. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 se une a un fragmento del polipéptido EphB2 que comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940 o más aminoácidos contiguos mostrados en las Figuras 2, 4 ó 6. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 puede unirse a EphB2 humano, EphB2 murino, EphB2 de roedor y/o EphB2 de mono. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 se une a EphB2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a ECD de EphB2. ECD de EphB2 se conocen en la técnica. Se entiende que un agente anti-EphB2 (tal como un anticuerpo anti-EphB2) puede reconocer uno o más polipéptidos EphB2 de secuencia nativa. Es rutina en la materia seleccionar agentes (tales anticuerpos) que se unen a uno o más de tales polipéptidos y adicionalmente para determinar si un agente reconoce uno o más de tales polipéptidos.

[0087] Proteínas anti-EphB2 que comprenden una región de unión a EphB2 incluyen, por ejemplo, inmunoadhesinas de efrina-B1, inmunoadhesina de efrina-B2, inmunoadhesina de efrina-B3 e inmunoadhesina de efrinas-A4. Por comodidad, la detección usando anticuerpos anti-EphB2 se trata generalmente en el presente documento. Se entiende que los agentes anti-EphB2 pueden usarse generalmente en lugar de (o además de) un anticuerpo en los procedimientos descritos en el presente documento.

[0088] La expresión de proteínas en una muestra puede examinarse usando protocolos de inmunohistoquímica y de tinción. Se ha mostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido es un procedimiento fidedigno de evaluación o detección de la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente por procedimientos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de muestras puede usarse una muestra de tejido o célula de un mamífero (normalmente un paciente humano). Ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas tales como células de cáncer de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma y leucemia. La muestra puede obtenerse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija e incorpora en parafina o similares. La muestra de tejido puede fijarse (es decir, preservarse) por metodología convencional (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto en la materia apreciará que la elección de un fijador se determina con el fin de que la muestra sea histológicamente teñida o analizada de otro modo. Un experto en la materia también apreciará que la longitud de fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador usado. A modo de ejemplo, formalina tamponada neutra, Bouin o paraformaldehído pueden usarse para fijar una muestra. Generalmente, la muestra se fija primero y luego se deshidrata mediante una serie ascendente de alcoholes, se infiltra y se incorpora en parafina u otros medios de seccionamiento de manera que la muestra de tejido pueda seccionarse. Alternativamente, el tejido puede seccionarse y fijarse las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido puede incorporarse y procesarse en parafina por metodología convencional (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). Ejemplos de parafina que pueden usarse incluyen, pero no se limita a, Paraplast, Broloid y Tissuemay. Una vez se ha incorporado la muestra de tejido, la muestra puede seccionarse por un microtomo o similares (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). A modo de ejemplo para este procedimiento, las secciones pueden oscilar de aproximadamente tres micrómetros a aproximadamente cinco micrómetros de espesor. Una vez se han seccionado, las secciones pueden unirse a portaobjetos por varios procedimientos convencionales. Ejemplos de adhesivos a portaobjetos incluyen, pero no se limitan a, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, las secciones incorporadas en parafina pueden unirse a

portaobjetos positivamente cargados y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Si se ha usado parafina como material de incorporación, las secciones de tejido se desparafinan generalmente y se rehidratan en agua. Las secciones de tejido pueden desparafinarse por varias metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, pueden usarse xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). Alternativamente pueden usarse agentes no orgánicos desparafinantes comercialmente disponibles tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

[0089] Opcionalmente, posterior a la preparación de muestras, una sección de tejido puede analizarse usando IHC. La IHC puede realizarse en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación por fluorescencia *in situ*. Están disponibles dos procedimientos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la unión de anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, EphB2) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado tal como una marca fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que puede visualizarse sin más interacción con el anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario sin conjugar se une al antígeno y luego un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Si el anticuerpo secundario está conjugado con una marca enzimática, un sustrato cromogénico o fluorogénico se añade para proporcionar visualización del antígeno. La amplificación de señales se produce debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopes sobre el anticuerpo primario.

[0090] El anticuerpo primario y/o secundario usado para inmunohistoquímica normalmente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosas marcas que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, Coligen y col., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse usando recuento por centelleo.

(b) Partículas de oro coloidal.

(c) Marcas fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficoeriterina, ficocianina, o fluoróforos comercialmente disponibles tales SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando las técnicas desveladas en *Current Protocols in Immunology*, arriba, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(d) Están disponibles diversas marcas enzima-sustrato y la patente de EE.UU. n° 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de estas. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y luego puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. n° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73:147-166 (1981).

[0091] Ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa).

[0092] Están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato para aquellos expertos en la materia. Para una revisión general de éstas véanse las patentes de EE.UU. n° 4.275.149 y 4.318.980. Algunas veces, la marca está indirectamente conjugada con el anticuerpo. El experto conocerá muy bien diversas técnicas

para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las cuatro amplias categorías de marcas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, por tanto, la marca puede conjugarse con el anticuerpo en este modo indirecto. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño y uno de los diferentes tipos de marcas mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno. Por tanto, puede lograrse la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo.

[0093] Aparte de los procedimientos de preparación de muestras tratados anteriormente, puede desearse tratamiento adicional de la sección de tejido antes de, durante o tras la IHC, Por ejemplo, pueden llevarse a cabo procedimientos de recuperación de epítopes tales como calentamiento de la muestra de tejido en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong y col. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

[0094] Tras una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y bajo condiciones adecuadas de forma que el anticuerpo primario se una al antígeno de proteína diana en la muestra de tejido. Condiciones apropiadas para alcanzar esto pueden determinarse por experimentación rutinaria. El grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina usando una cualquiera de las marcas detectables tratadas anteriormente. Preferentemente, la marca es una marca enzimática (por ejemplo HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico tal como el cromógeno 3,3'-diaminobencidina. Preferentemente, la marca enzimática está conjugada con anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anti-conejo).

[0095] Los especímenes así preparados pueden montarse y cubrirse con cubreobjetos. Entonces, la evaluación de portaobjetos se determina, por ejemplo, usando un microscopio, y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción, usados rutinariamente en la materia. Los criterios de intensidad de tinción pueden evaluarse del siguiente modo:

TABLA 1

Patrón de tinción	Puntuación
No se observa tinción en células.	0
Se detecta tinción débil/escasamente perceptible en más del 10% de las células.	1+
Se observa tinción de débil a moderada en más del 10% de las células.	2+
Se observa tinción de moderada a fuerte en más del 10% de las células.	3+

[0096] Se entiende que cuando las células y/o tejido de un tumor o adenoma de colon se examinan usando IHC, la tinción se determina o evalúa generalmente en célula y/o tejido de tumor (a diferencia de tejido de estroma o de alrededor que puede estar presente en la muestra). Normalmente, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 2+ o superior en un ensayo de IHC es pronóstica. En algunas realizaciones, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 1+ o superior es pronóstica. En otras realizaciones, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 3 o superior es pronóstica.

[0097] En algunas realizaciones, la muestra biológica puede ponerse en contacto con un agente anti-EphB2 (tal como un anticuerpo que se une a EphB2) en condiciones suficientes para que se forme un complejo agente anti-EphB2--EphB2, y luego detectar dicho complejo. La detección puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica tales como por transferencia Western y procedimientos de ELISA para ensayar una amplia variedad de tejidos y muestras, que incluyen plasma o suero. Está disponible un amplio intervalo de técnicas de inmunoensayo usando un formato de ensayo tal, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Éstos incluyen tanto ensayos de "sándwich" de un único sitio como de dos sitios de los tipos no competitivos, además de en los ensayos competitivos de unión tradicional. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo marcado con EphB2.

[0098] Los ensayos de sándwich están entre los ensayos más útiles y comúnmente usados. Existen varias variaciones de la técnica de ensayos de sándwich, y todas pretenden estar englobadas por la presente invención. Brevemente, en un ensayo directo típico, un anticuerpo sin marcar se inmoviliza sobre un sustrato sólido, y la muestra a probarse se pone en contacto con la molécula unida. Después de un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, un segundo anticuerpo específico para el antígeno, marcado con una molécula indicadora que puede producir una señal detectable, se añade luego y se incuba, dejando tiempo suficiente para la formación de otro complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. Cualquier material sin reaccionar se lava, y la presencia del antígeno se determina por observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser o bien cualitativos, por simple observación de la señal visible, o bien pueden ser cuantificados comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de biomarcador.

[0099] Variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo en el que tanto muestra como anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son muy conocidas para

aquellos expertos en la materia, que incluyen cualquier variación menor como será rápidamente evidente. En un ensayo de sándwich directo típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad por el biomarcador se une o bien covalentemente o bien pasivamente a una superficie sólida. La superficie sólida es normalmente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente usados los polímeros celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son muy conocidos en la técnica y generalmente consisten en reticular, unir covalentemente o adsorber físicamente, el complejo polímero-anticuerpo se lava en la preparación para la muestra de prueba. Entonces, una alícuota de la muestra a probar se añade al complejo de fase sólida y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos o durante la noche si es más conveniente) y bajo condiciones adecuadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 40°C tal como entre 25°C y 32°C, ambos incluidos) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Tras el periodo de incubación, la fase sólida de la subunidad de anticuerpo se lava y se seca y se incuba con un segundo anticuerpo específico para una parte del biomarcador. El segundo anticuerpo se liga a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al marcador molecular.

[0100] Procedimientos alternativos implican inmovilizar los biomarcadores diana en la muestra y luego exponer la diana inmovilizada al anticuerpo específico que puede o puede no marcarse con una molécula indicadora. Dependiendo de la cantidad de diana y la concentración de la molécula señal indicadora, una diana unida puede ser detectable por marcado directo con el anticuerpo. Alternativamente, un segundo anticuerpo marcado, específico para el primer anticuerpo, se expone al complejo diana-primer anticuerpo para formar un complejo terciario diana-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. El complejo se detecta por la señal emitida por la molécula indicadora. Por "molécula indicadora", como se usa en la presente memoria descriptiva, se indica una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección de anticuerpo unido a antígeno. Las moléculas indicadoras más comúnmente usadas en este tipo de ensayo son moléculas que contienen o bien enzimas, fluoróforos o bien radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes.

[0101] En el caso de un enzoinmunoensayo, una enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o perydato. Como será fácilmente reconocido, sin embargo, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes, que están fácilmente disponibles para el experto. Las enzimas comúnmente usadas incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, -galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que van a usarse con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos que dan un producto fluorescente en vez de los sustratos cromogénicos anotados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al complejo primer anticuerpo-marcador molecular, se deja que se una y luego se lava el reactivo en exceso. Luego se añade una disolución que contiene el sustrato apropiado al complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima ligada al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa que puede cuantificarse adicionalmente, normalmente espectrofotométricamente, dando una indicación de la cantidad de biomarcador que estaba presente en la muestra. Alternativamente, compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activan por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, induciendo un estado para la excitabilidad en la molécula, seguido de emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Como en EIA, se deja que el anticuerpo marcado fluorescente se una al complejo primer anticuerpo-marcador molecular. Después de lavar el reactivo sin unir, el complejo terciario restante se expone luego a luz de la longitud de onda apropiada, la fluorescencia observada indica la presencia del marcador molecular de interés. La inmunofluorescencia y las técnicas de EIA están ambas muy bien establecidas en la materia. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras tales como moléculas de radioisótopo, quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

[0102] En algunas realizaciones se detecta la expresión de ligandos de EphB2 tales como efrina-B1, efrina-B2, efrina-B3 y/o efrina-A4 (sola o conjuntamente con la expresión de EphB2) como se describe adicionalmente en el presente documento. En otras realizaciones más, la expresión de APC, p53, DCC, DPC4, Jv18-1/MADR2 y/o ras (tal como c-Ki-ras o N-ras) se detecta conjuntamente con la expresión de EphB2.

[0103] La expresión de EphB2 en una muestra biológica también puede detectarse usando ensayos funcionales o basados en actividad. Los procedimientos para ensayar la función de EphB2 se conocen en la técnica e incluyen el ensayo descrito en Mao y col. Cancer Res. 64: 781-788, 2004.

Detección de polinucleótidos EphB2

[0104] En el presente documento se desvelan procedimientos para detectar (por ejemplo, presencia o ausencia de o cantidad) un polinucleótido(s) (por ejemplo, polinucleótidos EphB2) en una muestra biológica de un

sujeto, tal como un sujeto humano. Pueden emplearse una variedad de procedimientos para detectar polinucleótidos e incluyen, por ejemplo, RT-PCR, TaqMan, procedimientos de amplificación, micromatriz de polinucleótidos y similares.

5 **[0105]** Los procedimientos para la detección de polinucleótidos (tales como ARNm) son muy conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tal como hibridación *in situ* usando ribosondas de EphB2 marcadas), transferencia Northern y técnicas relacionadas, y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para EphB2, y otros procedimientos de detección de tipo amplificación tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SPIA, Ribo-
10 SPIA, SISBA, MMT y similares).

[0106] En algunas realizaciones, el (los) polinucleótido(s) (tal como un cebador y/o sonda) adecuado(s) para hibridación con el polinucleótido EphB2 se hibrida(n) con el polinucleótido EphB2 y no reacciona(n) significativamente de forma cruzada con polinucleótido EphB1R y/o polinucleótido EphB3R. En algunas
15 realizaciones, el polinucleótido se hibrida con el polinucleótido EphB2 y no reacciona significativamente de forma cruzada con el polinucleótido EphB1R, polinucleótido EphB3R, polinucleótido EphB4R, polinucleótido EphB5R y/o polinucleótido EphB6R. En algunas realizaciones, el polinucleótido que se hibrida con el polinucleótido EphB2 comprende al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000, 1100, 1200,
20 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 3400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500 o más nucleótidos contiguos. En algunas realizaciones, el polinucleótido que se hibrida con el polinucleótido EphB2 comprende al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500,
25 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 3400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500 o más nucleótidos contiguos mostrados en la Figura 2, 4 y/o 6. En algunas realizaciones, el polinucleótido que se hibrida con el polinucleótido EphB2 es EphB2 humano, EphB2 murino, EphB2 de roedor y/o EphB2 de mono. En algunas realizaciones, el polinucleótido que se hibrida con el polinucleótido EphB2 es EphB2 humano. Se entiende que un polinucleótido que se hibrida con EphB2 puede hibridarse con uno o más polinucleótidos EphB2 de secuencia nativa. Es rutina en la materia seleccionar polinucleótidos que se unen a uno o más polinucleótidos EphB2 de secuencia nativa y adicionalmente
30 determinar si un polinucleótido reconoce uno o más polinucleótidos EphB2 de secuencia nativa.

[0107] Muestras biológicas de mamíferos pueden ensayarse convenientemente para, por ejemplo, ARNm de EphB2 usando transferencia Northern, puntual o análisis por PCR. Por ejemplo, ensayos de RT-PCR tales como ensayos de PCR cuantitativa son muy conocidos en la técnica. En una realización ilustrativa de la invención, un
35 procedimiento para detectar ARNm de EphB2 en una muestra biológica comprende producir ADNc de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc así producido usando un polinucleótido EphB2 como cebadores de sentido directo y de sentido contrario para amplificar ADNc de EphB2 en su interior; y detectar la presencia o ausencia del ADNc de EphB2 amplificado. Además, tales procedimientos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar la cantidad (niveles) de ARNm de EphB2 en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativo de un gen de mantenimiento tal como un miembro de la familia de actina). Opcionalmente puede determinarse la secuencia del ADNc de EphB2 amplificado.

[0108] Sondas y/o cebadores pueden marcarse con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Tales sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos EphB2 en una muestra y como un medio para detectar una célula que expresa proteínas EphB2. Como será entendido por el experto, pueden prepararse muchos cebadores y sondas diferentes (por ejemplo, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento) y usarse eficazmente para amplificar, clonar y/o determinar la presencia
50 o ausencia de y/o cantidad de ARNm de EphB2.

[0109] Procedimientos opcionales de la invención incluyen protocolos que comprenden detección de polinucleótidos tales como polinucleótido EphB2 en una muestra de tejido o célula usando tecnologías de micromatriz. Por ejemplo, usando micromatrices de ácidos nucleicos, muestras de ARNm de prueba y de control y
55 muestras de de tejido de prueba y control se transcriben de forma inversa y se marcan para generar sondas de ADNc. Entonces, las sondas se hibridan con una matriz de ácidos nucleicos inmovilizada sobre un soporte sólido. La matriz está configurada de forma que la secuencia y posición de cada miembro de la matriz sea conocida. Por ejemplo, una selección de genes que tienen potencial para expresarse en ciertos estados de enfermedad puede matrizarse sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. Los análisis de expresión génica diferencial de tejido de enfermedad pueden proporcionar información valiosa. La tecnología de micromatrices utiliza técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología de cálculo para evaluar el perfil de expresión de ARNm de miles de genes dentro de un único experimento (véase, por ejemplo, el documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; (véanse, por ejemplo, el documento U.S. 5.700.637, la patente de EE.UU. 5.445.934 y la patente de
60 EE.UU. 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. y col., Nature Genetics

21(Suppl):15-19 (1999) para una discusión de la fabricación de matrices). Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos de genes que o bien se sintetizan directamente sobre o bien se aplican en puntos sobre vidrio u otros sustratos. Miles de genes están normalmente representados en una única matriz. Un experimento de micromatrices típico implica las siguientes etapas: 1. preparación de diana fluorescentemente marcada de ARN aislado de la muestra, 2. hibridación de la diana marcada con la micromatriz, 3. lavado, tinción y barrido de la matriz, 4. análisis de la imagen barrida y 5. generación de perfiles de expresión génica. Actualmente están usándose dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (normalmente 25 a 70-meros) y matrices de expresión génica que contienen productos de PCR preparados a partir de ADNc. En la formación de una matriz, los oligonucleótidos pueden o bien prefabricarse y aplicarse en puntos a la superficie o bien sintetizarse directamente sobre la superficie (*in situ*).

[0110] El sistema GeneChip® de Affymetrix es un sistema de micromatrices comercialmente disponible que comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Matrices de sondas/genes: los oligonucleótidos, normalmente 25 meros, se sintetizan directamente sobre una oblea de vidrio mediante una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías químicas de síntesis en fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligonucleótidos diferentes y cada oligonucleótido está presente en millones de copias. Como las sondas de oligonucleótidos se sintetizan en localizaciones conocidas sobre la matriz, los patrones de hibridación y las intensidades de señal pueden interpretarse en términos de identidad génica y niveles relativos de expresión por el software Affymetrix Microarray Suite. Cada gen está representado sobre la matriz por una serie de sondas de oligonucleótidos diferentes. Cada par de sondas consiste en un oligonucleótido de apareamiento perfecto y un oligonucleótido de desapareamiento. La sonda de apareamiento perfecto tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y, por tanto, mide la expresión del gen. La sonda de desapareamiento se diferencia de la sonda de apareamiento perfecto por una única sustitución de bases en la posición de bases central, perturbando la unión del transcrito del gen diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de fondo y no específica que contribuye a la señal medida para el oligonucleótido de apareamiento perfecto. El software Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas de desapareamiento de aquellas de las sondas de apareamiento perfecto para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se eligen basándose en la actual información de Genbank y otros repositorios de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas del extremo 3' del gen. Se usa un horno de hibridación de GeneChip (horno "asador") para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación hidráulica realiza el lavado y la tinción de las matrices de sondas. Está completamente automatizada y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo está controlado independientemente por el software Microarray Suite usando protocolos hidráulicos previamente programados. El escáner es un escáner de fluorescencia láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. El terminal de trabajo informático con el software Microarray Suite controla la estación hidráulica y el escáner. El software Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones hidráulicas usando protocolos de hibridación previamente programados, de lavado y de tinción para la matriz de sondas. El software adquiere y convierte los datos de intensidad de hibridación en una llamada de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos apropiados. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos por análisis de comparación y formatea las salidas en archivos .txt que pueden usarse con otros programas informáticos para el análisis de datos adicional.

[0111] En algunas realizaciones se detecta la delección del gen, mutación del gen o amplificación del gen EphB2. La delección del gen, mutación del gen o amplificación puede medirse por una cualquiera de una amplia variedad de protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH) usando una sonda apropiadamente marcada, procedimientos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (CGH) usando una sonda apropiadamente marcada. Además, estos procedimientos pueden emplearse para detectar delección del gen del ligando de EphB2, mutación del ligando o amplificación del gen. Como se usa en el presente documento, "detectar la expresión de EphB2" engloba la detección de la delección del gen, mutación del gen o amplificación del gen EphB2.

[0112] Adicionalmente puede examinarse el estado de metilación del gen EphB2 en una muestra de tejido o de células. La desmetilación y/o hipermetilación aberrante de islas CpG en las regiones reguladoras de 5' del gen producida frecuentemente en células inmortalizadas y transformadas puede producir expresión alterada de diversos genes. Son muy conocidos en la técnica una variedad de ensayos para examinar el estado de metilación de un gen. Por ejemplo, pueden utilizarse, en soluciones de hibridación Southern, enzimas de restricción sensibles a la metilación que no pueden escindir secuencias que contienen sitios CpG metilados para evaluar el estado de metilación de islas CpG. Además, MSP (PCR específica de metilación) puede perfilar rápidamente el estado de metilación de todos los sitios CpG presentes en una isla CpG de un gen dado. Este procedimiento implica la modificación inicial de ADN por bisulfito de sodio (que convertirá todas las citosinas sin metilar en uracilo), seguido de amplificación usando cebadores específicos para ADN metilado frente a sin metilar. Los protocolos que implican la interferencia de metilación también pueden encontrarse, por ejemplo, en Current Protocols In Molecular Biology, unidad 12, Frederick M. Ausubel y col. eds., 1995; De Marzo y col., Am. J. Patol. 155(6): 1985-1992 (1999); Brooks y col., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536; y Lethe y col., Int. J. Cancer 76 (6): 903-908 (1998).

Como se usa en el presente documento, “detectar la expresión de EphB2” engloba la detección de la metilación del gen EphB2.

[0113] En algunas realizaciones, la expresión de ligandos de EphB2 tales como efrina-B1, efrina-B2, efrina-B3 y/o efrina-A4 se detecta (sola o conjuntamente (simultáneamente y/o secuencialmente)) con la expresión de EphB2 como se describe adicionalmente en el presente documento. En otras realizaciones más, la expresión de APC, p53, DCC, DPC4, JV18-1/MADR2 y/o ras (tal como c-Ki-ras o N-ras) se detecta conjuntamente con la expresión de EphB2.

10 Detección del ligando de EphB2

[0114] En los procedimientos de la presente invención, la muestra biológica también puede examinarse (tanto conjuntamente con la expresión de EphB2 como independientemente) para la expresión de ligando(s) de EphB2 (tal como polipéptido y/o polinucleótido del ligando de EphB2). Como se ha descrito anteriormente y en la materia, actualmente se cree que EphB2 se une a al menos cuatro ligandos diferentes: efrina-B1, efrina-B2, efrina-B3 y efrina-A4. Usando procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en el presente documento, puede detectarse la expresión del polinucleótido y/o polipéptido de efrina-B1, efrina-B2, efrina-B3 y/o efrina-A4. A modo de ejemplo, las técnicas de IHC descritas anteriormente pueden emplearse para detectar la presencia de una o más de tales moléculas en la muestra. Como se usa en el presente documento, “conjuntamente” pretende englobar cualquier detección simultánea y/o secuencial. Por tanto, se contempla que en realizaciones en las que una muestra biológica esté siendo examinada no sólo para la presencia de EphB2, sino también para la presencia de, por ejemplo, efrina-B1, efrina-B2, efrina-B3, y/o efrina-A4, puedan prepararse portaobjetos separados a partir del mismo tejido o muestra, y probar cada portaobjetos con un reactivo que se une a EphB2 y/o ligando, respectivamente. Alternativamente puede prepararse un único portaobjetos a partir de la muestra de tejido o célula, y pueden usarse anticuerpos dirigidos a EphB2 y ligando a propósito de un protocolo de tinción de múltiples colores para permitir la visualización y detección de EphB2 y ligando.

Análisis y comparación de datos

[0115] Los datos generados por la detección pueden analizarse usando cualquier medio adecuado (por ejemplo, visualmente, por ordenador, etc.). En una realización, los datos se analizan usando un ordenador digital programable. El análisis de datos puede incluir las etapas de determinar la intensidad de la señal. La intensidad puede normalizarse, por lo que la intensidad se calibra con respecto a algún valor de referencia. Por ejemplo, una referencia puede ser ruido de fondo de la unión. Alternativamente, una referencia puede ser la intensidad de unión a proteína de un anticuerpo de control. La comparación de la expresión de EphB2 (por ejemplo, comparación del nivel de expresión en una muestra biológica de prueba y una muestra de control biológica o nivel de referencia de control) puede realizarse mediante procedimientos convencionales, que incluyen procedimientos estadísticos convencionales como prueba de la chi al cuadrado, prueba de la t de Student o correlación del orden de Spearman según convenga. Procedimientos estadísticos adicionales se tratan en Wohlgemuth y col., documento US2004/0009479 A1; Birbeck y col. *Annals Surg* 235:449-457 (2002) y se ejemplifican en el presente documento. Están ampliamente disponibles paquetes de software para realizar el análisis estadístico.

Procedimientos que comprenden la selección del tratamiento contra el cáncer

[0116] En el presente documento se desvelan procedimientos para la selección del tratamiento contra el cáncer. Como se observa anteriormente, el tratamiento contra el cáncer, tal como quimioterapia, radiación y/o cirugía, tiene riesgos asociados y sería útil poder seleccionar óptimamente los pacientes más probables a beneficiar. La prueba de pronóstico es útil, por ejemplo, para identificar pacientes con males pronósticos de forma que se identifique un enfoque de tratamiento de mayor riesgo más agresivo, y para identificar pacientes con buenos pronósticos para los cuales una terapia arriesgada no proporcionaría suficiente beneficio para garantizar los riesgos. Por consiguiente, se desvelan procedimientos para la selección del tratamiento contra el cáncer para un paciente, comprendiendo los procedimientos (a) comparar la expresión de EphB2 en una muestra biológica del paciente con la expresión de EphB2 en una muestra de control (o valor de referencia de control); (b) predecir el pronóstico de cáncer del paciente basándose en la comparación en (a), en el que la expresión de EphB2 es pronóstica de cáncer en el paciente; y (c) posterior a las etapas (a) y (b), seleccionar el tratamiento contra el cáncer para el paciente, en el que la selección del tratamiento se basa en el pronóstico del paciente determinado en la etapa (b). En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra (de prueba) del paciente es pronóstico de cáncer en el paciente.

[0117] En el presente documento se desvelan procedimientos para seleccionar tratamiento contra el cáncer para paciente, comprendiendo los procedimientos: (a) obtener una muestra biológica del paciente; (b) detectar la expresión de EphB2 en la muestra biológica, en el que la expresión de EphB2 es pronóstica de cáncer en el paciente; y (c) posterior a las etapas (a) y (b), seleccionar el tratamiento contra el cáncer para el paciente, en el que la selección del tratamiento se basa en el pronóstico del paciente determinado en la etapa (b). En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente es pronóstico de cáncer en

el paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento engloba mejorar, reducir la incidencia de, paliar, retrasar el desarrollo de y/o retrasar la progresión de cáncer.

[0118] En el presente documento se describen cánceres a modo de ejemplo. Los tratamientos para el cáncer son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita y col., eds., Williams & Wilkins Co., 2001); Manual of Clinical Oncology (Casciato, DA, ed., Lippincott, Williams & Wilkins Co., 2000); Bacquiran, DC ed., Lippincott's Cancer Chemotherapy Handbook, Lippincott Co., 2001); Armitage, JO, ed., High-Dose Cancer Therapy, Lippincott, Williams & Wilkins Co., 1999). En algunas realizaciones, el tratamiento comprende la administración de una cantidad eficaz de un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-EphB2 conjugado con agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina activa de origen sintético, bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Los inmunocombinados se conocen en la técnica e inmunocombinados a modo de ejemplo se describen en el presente documento. Véase también Pennell, CA. Immunol. Res. 25,177-191 (2002; Kreitman, RJ, Curr. Pharm. Biotechnol. 2: 313-325 (2001).

[0119] Adicionalmente se desvela el uso de agentes anti-EphB2 (tal como un anticuerpo antagonista). Puede usarse una proteína anti-EphB2 que comprende una región de unión a EphB2, por ejemplo, una inmunoadhesina de efrina-B1, inmunoadhesina de efrina-B2, inmunoadhesina de efrina-B3 e inmunoadhesina de efrinas-A4. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606 (depositado el 24 de febrero de 2005). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es un anticuerpo que comprende dominio(s) variable(s) de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a EphB2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 comprende al menos uno (al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 y/o 6) secuencia(s) hipervariable(s) (HVR(s)) que comprende(n) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y/o HVR-H3 del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a EphB2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es un anticuerpo que se une al mismo epítipo sobre EphB2 humano que el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 es un anticuerpo que compite con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2H9.11.14 que tiene el nº de la Colección americana de cultivos de tejido tipo (ATCC) PTA-6606 por unirse a EphB2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EphB2 comprende: al menos una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis secuencias de regiones hipervariables (HVR) seleccionadas del grupo que consiste en: (a) HVR-L1 que comprende la secuencia KSSQSLNLSGNQENYLA (SEQ ID NO:1); (b) HVR-L2 que comprende la secuencia GASTRES (SEQ ID NO:2); (c) HVR-L3 que comprende la secuencia QNDHSDYPT (SEQ ID NO:3); (d) HVR-H1 que comprende la secuencia SYWMH (SEQ ID NO:4); (e) HVR-H2 que comprende la secuencia FINPSTGYTDYNQKFKD (SEQ ID NO:5); y (f) HVR-H3 que comprende la secuencia RLKLLRYAMDY (SEQ ID NO:6). En una realización, el anticuerpo anti-EphB2 comprende un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia:

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMCKSSQSLNLSGNQENYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCQNDHSDYPTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:7). En una realización, el anticuerpo anti-EphB2 comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGFINPSTGYTDYNQKFKD
KATLTVKSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCTRRLKLLRYAMDYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:8). En una realización, el anticuerpo anti-EphB2 comprende un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia:

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMCKSSQSLNLSGNQENYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCQNDHSDYPTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:7); y comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGFINPSTGYTDYNQKFKD
KATLTVKSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCTRRLKLLRYAMDYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:8).

Anticuerpos anti-EphB2 a modo de ejemplo adicionales se describen en el presente documento.

[0120] En el presente documento se desvela el uso de inmunocombinados (llamados indistintamente "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-EphB2 descritos en el presente documento conjugados con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un

agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0121] El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; patente de EE.UU. 4.975.278) permite la administración elegida como diana del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en su interior, en el que la administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad a células normales, además de las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin y col., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchera y col. (eds), pp. 475-506). Así se busca la máxima eficacia con toxicidad mínima. Se ha informado de tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales como útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland y col., (1986) arriba). Las toxinas usadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler y col. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler y col. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler y col. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman y col. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

[0122] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante de ligador de tiourea (Wiseman y col. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman y col. (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig y col. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig y col. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; patentes de EE.UU. n° 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 ligado por el ligador de disulfuro SPP al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está avanzando en ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tal como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) ligado al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina y col. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

[0123] Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en el presente documento (por ejemplo, arriba). Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcinas, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0124] Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas

que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

i. Maitansina y maitansinoides

5 **[0125]** En algunas realizaciones, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) de la invención conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

[0126] Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. nº 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. nº 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

15 **[0127]** Los restos de fármacos maitansinoides son restos de fármaco en conjugados anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) favorecen la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación mediante ligadores de no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra una variedad de
20 líneas celulares tumorales.

[0128] Los inmunoc conjugados que contienen maitansinoides, procedimientos de preparación de los mismos y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron
25 inmunoc conjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoc conjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un ligador de disulfuro con el anticuerpo A7 murino que se une a un antígeno en líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del
30 conjugado TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en
35 ratones.

[0129] Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan ligando químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de tanto el anticuerpo como la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas
40 de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.208.020 y en las otras
45 patentes y publicaciones de no patente citadas anteriormente en el presente documento. Maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como diversos ésteres de maitansinol.

[0130] Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los desvelados en las patentes de EE.UU. nº 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992). Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente de ligador SMCC pueden prepararse como se desvela en la solicitud de patente de EE.UU. nº 2005/1699331. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o lábiles de esterasa, como se desvela en las patentes anteriormente
55 identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter. Grupos de enlace adicionales se describen y ejemplifican en el presente documento.

[0131] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Agentes de acoplamiento
60 particularmente preferidos incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson y col., Biochem.

J. 173:723-737 (1978)) y 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

[0132] El ligador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante la reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en posición la C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

10 ii. Auristatinas y dolostatinas

[0133] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolostatinas o análogos y derivados peptídicos de dolostatina, las auristatinas (patentes de EE.UU. n° 5635483; 5780588). Se ha mostrado que las dolostatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit y col. (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965). El resto del fármaco dolostatina o auristatina puede unirse al anticuerpo mediante el extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

20 **[0134]** Realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen el extremo N ligado a restos del fármaco monometilauristatina DE y DF, desvelado en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", solicitud de EE.UU. 2005/238649 publicada el 27-10-2005.

[0135] Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos. Los restos del fármaco auristatina/dolostatina pueden prepararse según los procedimientos de: documentos US 5635483; US 5780588; Pettit y col. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit y col. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., y col. Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit y col. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863; y Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784. "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", solicitud de EE.UU. 2005/238649 (que desvela, por ejemplo, ligadores y procedimientos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con ligadores).

35 iii. Caliqueamicina

[0136] En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse las patentes de 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman y col., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode y col., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelular y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes por la internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

50 iv. Otros agentes citotóxicos

[0137] Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptoizocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida conjuntamente el complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. 5.053.394, 5.770.710, además de esperamicinas (patente de EE.UU. 5.877.296).

55 **[0138]** Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurica fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

[0139] La presente divulgación contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNsa).

- [0140]** Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.
- 10 **[0141]** Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CCR Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

- [0142]** Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil de ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari y col., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. nº 5.208.020).

- [0143]** Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de ligador cruzado: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco

- 40 **[0144]** En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) está conjugado con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, mediante un ligador (L). El ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de ligador bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de ligador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Procedimientos adicionales para preparar ADC se describen en el presente documento.



- [0145]** El ligador puede estar compuesto por uno o más componentes de ligador. Componentes de ligador a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Componentes de ligador adicionales se conocen en la técnica y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", solicitud de EE.UU. 2005/238649

- 60 **[0146]** En algunas realizaciones, el ligador puede comprender residuos de aminoácidos. Componentes de ligador de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Residuos de aminoácidos que comprenden un componente de ligador de aminoácidos incluyen aquellos que se producen naturalmente, además de aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que se producen no naturalmente, tales

como citrulina. Los componentes de ligador de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

5 **[0147]** Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de ligador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Por tanto, cada puente de cisteína formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos).

20 **[0148]** Los conjugados anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de ligador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos de ligador o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff de iminas resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glucosilado con tanto galactosa oxidasa como meta-peryodato de sodio pueden dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; documento US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo ligador.

[0149] Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

40 **[0150]** Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

45 **[0151]** En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

50 **[0152]** Las formulaciones terapéuticas de anticuerpo anti-EphB2 se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20ª edición (2000)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tonificantes tales como trehalosa y cloruro sódico; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivo tal como polisorbato; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como

TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). La formulación comprende preferentemente el anticuerpo a una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferentemente entre 10-100 mg/ml.

5 **[0153]** Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición (2000).

10

[0154] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol 15 vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

20 **[0155]** Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0156] Los anticuerpos (tal como composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo) pueden administrarse a un paciente, según procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo 25 o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

En una realización, el tratamiento de la presente invención implica la administración combinada de un anticuerpo 30 anti-EphB2 y uno o más agentes quimioterapéuticos. La presente invención contempla la administración de mezclas de diferentes agentes quimioterapéuticos. La administración combinada incluye co-administración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

35

[0157] Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o según se determine empíricamente por el médico experto. Los programas de preparación y dosificación para quimioterapia también se describen en, por ejemplo, Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992) y Lippincott's Cancer Chemotherapy Handbook, Baquiran y 40 col., eds. Lippincott, Williams y Wilkins (2002). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir la administración del anticuerpo o puede administrarse simultáneamente con el mismo.

[0158] Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se define anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, 45 si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico adjunto. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. En una pauta de terapia de combinación, las composiciones de la presente invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o sinérgica. Como se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz es de forma que la co-administración de anticuerpo anti-EphB2 y 50 uno o varios de otros agentes terapéuticos, o la administración de una composición de la presente invención, produzca la reducción o inhibición de la enfermedad o afección que elige diana. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es la cantidad de anticuerpo anti-EphB2 y uno o varios de otros agentes terapéuticos necesarios para reducir o eliminar sinérgica o significativamente las afecciones o síntomas asociados a una enfermedad particular.

55 **[0159]** Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 μ g/kg a 50 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 μ g/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o prolongadas, dependiendo de la 60 afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. En un aspecto preferido, el anticuerpo de la invención se administra cada dos a tres semanas, a una dosis que oscila de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. El progreso de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales. La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse por diversos criterios de 65 valoración comúnmente usados en la evaluación de los tratamientos contra el cáncer que incluyen, pero no se

limitan a, regresión del tumor, encogimiento del peso o tamaño del tumor, tiempo hasta la progresión, la duración de la supervivencia, supervivencia libre de progresión, tasa de respuesta global, la duración de la respuesta y calidad de vida.

5 **Procedimientos de tratamiento de trastornos que comprenden adenomas de colon**

[0160] En el presente documento se desvelan adicionalmente procedimientos para detectar la expresión de EphB2 en adenomas de colon, y procedimientos para tratar trastornos caracterizados por adenomas de colon (indistintamente llamados "trastornos de adenoma de colon"). Los solicitantes encontraron sorprendentemente que EphB2 se expresa en exceso en adenomas de colon. Por consiguiente, EphB2 es una diana atractiva para terapia con inmunoconjugados para trastornos que caracterizan adenomas de colon, por ejemplo, poliposis adenomatosa familiar (PAF), en la que pacientes desarrollan grandes números de pólipos adenomatosos colónicos. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona procedimientos para tratar un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno caracterizado por adenoma(s) de colon administrando una cantidad eficaz de un inmunoconjugado anti-EphB2 al paciente. Adicionalmente se desvelan procedimientos para mejorar, reducir la incidencia de, paliar, retrasar el desarrollo de, retrasar la progresión de o prevenir un trastorno caracterizado por adenoma(s) de colon administrando una cantidad eficaz de un inmunoconjugado anti-EphB2 a un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno caracterizado por adenoma(s) de colon. En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para tratar un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno caracterizado por adenoma(s) de colon administrando una cantidad eficaz de un agente anti-EphB2 (tal como un anticuerpo) al paciente. Adicionalmente se desvelan procedimientos para mejorar, reducir la incidencia de, paliar, retrasar el desarrollo de, retrasar la progresión de o prevenir un trastorno caracterizado por adenoma(s) de colon administrando una cantidad eficaz de un agente anti-EphB2 (tal como un anticuerpo) a un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno caracterizado por adenoma(s) de colon.

[0161] Los procedimientos de la divulgación son particularmente adecuados para trastornos caracterizados por una pluralidad de adenomas de colon (tal como más de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más adenomas de colon), que incluyen al menos los siguientes: trastorno de poliposis adenomatosa familiar (PAF) dominante autosómica producida por mutación en el gen APC (Tomlinson y col., J Med Genet 1996;33:268-73); síndrome de Peutz-Jegher (PJS), síndrome de poliposis juvenil (JPS), PAF atenuada producida por mutaciones en el gen MYH (Sieber y col. N Eng J Med 348:791-9 (2003)), síndrome de poliposis mixta hereditaria (SPMH), enfermedad de Cowden y síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley. Véanse también Crawford JM, Gastrointestinal tract, en: Cotran RS y col. Robbin's Pathological Basis of Disease, 6ª ed. London: Saunders (1999) pp775-844; Nicum y col., Acta Oncol 42:263-275 (2003); Kinzler, KW y Vogelstein, B. Colorectal Tumors, en Kinzler KW, Vogelstein B, eds. The Genetic Basis of Human Cancer: McGraw-Hill 1999, pág. 565-87.

[0162] Agentes anti-EphB2 a modo de ejemplo (tal como anticuerpos e inmunoconjugados) se describen en el presente documento. En el presente documento se describen formulaciones y dosificaciones a modo de ejemplo. El progreso de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales como se conocen en la técnica y se desvelan en el presente documento. La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse por diversos criterios de valoración comúnmente usados en la evaluación de los tratamientos que incluyen, pero no se limitan a, regresión de adenomas, encogimiento de peso o tamaño de adenomas, tiempo hasta la progresión, la duración de la supervivencia, supervivencia libre de progresión, tasa de respuesta global, la duración de la respuesta y calidad de vida.

Procedimientos para la detección de la expresión de EphB2 en adenoma de colon

[0163] En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos que comprenden la detección de polipéptido(s) y/o polinucleótido(s) EphB2 en una muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon. Como se observa en el presente documento, los solicitantes encontraron sorprendentemente que EphB2 se expresa en exceso en adenomas de colon tales como adenomas planos, tubulares, tubulovelloso y vellosos. La detección de la expresión de EphB2 en adenomas de colon es útil, por ejemplo, para determinar la idoneidad para el tratamiento con un agente anti-EphB2 (tal como un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-EphB2), monitorizar el tratamiento con inmunoconjugados anti-EphB2 u otros agentes o intervenciones (por ejemplo, cirugía, radiación), determinar la reaparición de adenomas, monitorizar la progresión de adenomas, y similares. En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 se detecta antes; durante; después; antes y durante; antes y después; durante y después; antes, durante y después del tratamiento (por ejemplo, tratamiento con un agente anti-EphB2).

[0164] Por consiguiente, en un aspecto se proporcionan procedimientos para la detección de polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en una muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon, comprendiendo el procedimiento detectar la expresión de polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en la muestra biológica. En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para la detección de polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en una muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon, comprendiendo los procedimientos comparar la expresión de

polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en la muestra biológica con expresión de EphB2 en una muestra de control (o valor de referencia de control). En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a la muestra de control (o valor de referencia de control) es pronóstica de cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a la muestra de control (o valor de referencia de control) es pronóstica de cáncer en el sujeto.

[0165] Adicionalmente se proporcionan procedimientos para detectar la expresión de polinucleótidos y/o polipéptidos EphB2 en células y/o tejido de adenoma de colon de un paciente, comprendiendo los procedimientos: (a) obtener las células y/o tejido de adenoma de colon; y (b) detectar la expresión de EphB2 en las células y/o tejido de adenoma de colon. En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a una muestra de control (o un valor de referencia de control) es pronóstica de cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a la muestra de control (o valor de referencia de control) es pronóstica de cáncer en el sujeto.

[0166] Los procedimientos de la divulgación también pueden detectar polipéptido(s) y/o polinucleótido(s) de variante de EphB2 y/o fragmentos de EphB2. La detección de variantes y fragmentos de EphB2 se describe en el presente documento.

[0167] La detección de la expresión puede ser cuantitativa o cualitativa. La presencia y/o ausencia y/o nivel de expresión de EphB2 puede detectarse. Se entiende que la ausencia de expresión de EphB2 incluye niveles insignificantes, o de mínimos. La expresión de polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en la muestra biológica de prueba puede ser superior a la observada para una muestra de control biológica (llamada "expresión en exceso). En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces superior o superior en la muestra biológica de prueba. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se determina en un ensayo de inmunohistoquímica ("IHC") para puntuar al menos 2 o superior para intensidad de tinción. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido EphB2 se determina en un ensayo de IHC para puntuar al menos 1 o superior, o al menos 3 o superior para intensidad de tinción. La expresión de polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en la muestra biológica de prueba puede ser inferior a la observada para una muestra de control biológica (llamada "expresión por defecto). En algunas realizaciones, la expresión de EphB2 es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces inferior o inferior en la muestra biológica de prueba. Procedimientos para la detección de polinucleótido y/o polipéptido EphB2 se conocen en la técnica y se desvelan y ejemplifican en el presente documento.

[0168] En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para diagnosticar trastornos caracterizados por adenomas de colon, comprendiendo dichos procedimientos detección de polinucleótido y/o polipéptido EphB2 en una muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon. En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra biológica del paciente con respecto a una muestra de control (o un valor de referencia de control) es diagnóstico de un trastorno de adenoma de colon en el sujeto.

Kit, composiciones y artículos de fabricación

[0169] Para su uso en las aplicaciones descritas o sugeridas anteriormente también se proporcionan kits, composiciones y artículos de fabricación. En algunas realizaciones, los kits comprenden uno o más recipientes que comprenden un agente anti-EphB2 (tal como un anticuerpo), un inmunoconjugado anti-EphB2, un polinucleótido EphB2 y/o un polipéptido EphB2, y en algunas realizaciones comprenden además instrucciones para su uso según cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento (tal como procedimientos para evaluación (tal como evaluación de pronóstico) de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene cáncer, procedimiento para la selección del tratamiento contra el cáncer para un paciente, procedimientos para tratar un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon, procedimientos para detectar polinucleótido o polipéptido EphB2 en una muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon, procedimientos para detectar polinucleótido o polipéptido de la expresión de EphB2 en células de adenoma de colon o tejido de un paciente y/o procedimientos que comprenden detectar la expresión del polinucleótido o polipéptido EphB2 en la muestra biológica). Los kits puede comprender además un control adecuado (valor de referencia de control).

[0170] Tales kits pueden comprender un medio de vehículo que está compartimentalizado para recibir en estrecho confinamiento uno o más medios de recipiente tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada medio de recipiente uno de los elementos separados que va a usarse en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios del recipiente puede comprender un polinucleótido (tal como una sonda o cebador) que está o puede estar detectablemente marcado. Tal polinucleótido puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para una proteína EphB2 o un polinucleótido EphB2, respectivamente. Si el kit utiliza hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener, por ejemplo, recipientes que contienen nucleótido(s) para la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana y/o un recipiente que comprende un medio indicador tal

como una proteína de unión a biotina tal como avidina o estreptavidina, unida a una molécula indicadora, tal como una marca enzimática, fluorescente o de radioisótopo.

- [0171]** El kit comprenderá normalmente el recipiente descrito anteriormente y uno o varios de otros recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial o de usuario, que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones para su uso. Una etiqueta puede estar presente sobre el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y también puede indicar indicaciones para uso bien *in vivo* o bien *in vitro*, tal como aquellos descritos anteriormente.
- 10 **[0172]** Los kits tienen varias realizaciones. Una realización típica es un kit que comprende un recipiente, una etiqueta sobre dicho recipiente y una composición contenida dentro de dicho recipiente; en el que la composición incluye un anticuerpo primario que se une a una secuencia de polipéptidos de EphB2, la etiqueta sobre dicho recipiente indica que la composición puede usarse para evaluar la presencia de proteínas EphB2 en al menos un tipo de célula de mamífero, e instrucciones para usar el anticuerpo para EphB2 que comprende la detección de la presencia o ausencia de proteína EphB2 en al menos un tipo de célula de mamífero. El kit puede comprender además un conjunto de instrucciones y materiales para preparar una muestra de tejido y aplicar el anticuerpo y sonda a la misma sección de una muestra de tejido. El kit puede incluir tanto un anticuerpo primario como secundario, estando el anticuerpo secundario conjugado con una marca, por ejemplo, una marca enzimática.
- 15 **[0173]** Otra realización es un kit que comprende un recipiente, una etiqueta sobre dicho recipiente y una composición contenida dentro de dicho recipiente; en el que la composición incluye un polinucleótido que se hibrida con un complemento del polinucleótido EphB2 bajo condiciones rigurosas, la etiqueta sobre dicho recipiente indica que la composición puede usarse para evaluar la presencia de EphB2 en al menos un tipo de célula de mamífero, e instrucciones que comprenden el uso del polinucleótido EphB2 para evaluar la presencia de ARN o ADN de EphB2 en al menos un tipo de célula de mamífero.
- 20 **[0174]** Otros componentes opcionales en el kit incluyen uno o más tampones (por ejemplo, tampón de bloqueo, tampón de lavado, tampón de sustrato, etc.), otros reactivos tales como sustrato (por ejemplo, cromógeno) que es químicamente alterado por una marca enzimática, disolución de recuperación de epítopes, muestras de control (controles positivos y/o negativos), portaobjetos de control, etc.
- 25 **[0175]** Las composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) comprenden un agente anti-EphB2 (tal como un anticuerpo) e inmunoconjugado anti-EphB2, un polinucleótido EphB2 y/o un polipéptido EphB2, y en algunas realizaciones comprenden además instrucciones para su uso según cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento (tal como procedimientos para evaluación (tal como evaluación de pronóstico) de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene cáncer, procedimiento para la selección del tratamiento contra el cáncer para un paciente, procedimientos para tratar un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon, procedimientos para detectar polinucleótido o polipéptido EphB2 en una muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno de adenoma de colon, procedimientos para detectar la expresión de polinucleótidos o polipéptidos EphB2 en células de adenoma de colon o tejido de un paciente, y/o procedimientos que comprenden detectar la expresión del polinucleótido o polipéptido EphB2 en la muestra biológica).
- 30 **[0176]** Los artículos de fabricación pueden comprender componentes y/o composiciones de kit descritas en el presente documento.
- 35 **[0177]** Diversos aspectos de la invención se describen e ilustran adicionalmente a modo de los ejemplos que siguen, ninguno de los cuales pretende limitar el alcance de la invención.

50 EJEMPLOS

PROCEDIMIENTOS Y MATERIALES

Base de datos Gene Logic

- 55 **[0178]** La expresión de EphB2 se examinó en la base de datos Gene Logic (Gaithersburg, MD) de los datos de la matriz de sondas HG-U133 de Affymetrix (conjunto de sondas 209588_at) para tejidos colorrectales que incluyen colon normal (n = 288), adenomas (n = 30), cánceres primarios (n = 122), metástasis distantes (n = 55), epitelio normal microdisecionado por láser (n = 16) y epitelio microdisecionado por láser de cánceres primarios (n = 9). Brevemente, el análisis de la base de datos GeneExpress® (Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD), una base de datos patentada que contiene información de expresión génica, se realizó usando tanto software disponible mediante Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, para su uso con la base de datos GeneExpress®, como con software patentado escrito y desarrollado en Genentech, Inc. para su uso con la base de datos GeneExpress®. Véase Jubb y col., J Clin Pathol 2004 57:514-512 para descripción adicional del sistema GeneLogic. La clasificación de acontecimientos positivos en el análisis se basa en varios criterios que incluyen, por ejemplo, especificidad por
- 60
- 65

tejido, especificidad por tumor y nivel de expresión en tejidos esenciales normales y/o proliferantes normales.

Muestras de tejido y construcción de micromatrices de tejido (MMT)

5 Líneas celulares

[0179] Se obtuvieron Colo206 y CX-1 de DSMZ (Braunschweig, Alemania), KM12 se obtuvo del Instituto nacional del cáncer (Bethesda, MD), y todas las otras líneas celulares de CCR se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA). Las células se cultivaron en 50/50 de medio Ham's F12 y de Eagle modificado por Dulbecco, complementado con L-glutamina 2 mM y 10% de suero bovino fetal. El ARN total se recogió y se hibridó con matrices de sonda HG-U133 GeneChip de Affymetrix como se ha descrito previamente (Yang y col., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1797-803). Los sedimentos de células también se fijaron en formalina, se incorporaron en parafina y se representaron en MMT como se ha descrito previamente (Kononen y col. *Nat Med* 1998;4:844-7).

15 Tejidos humanos

[0180] Un comité de revisión ética (Universidad de Leeds, RU) aprobó el uso de todos los tejidos e información clínica. El archivo de histopatología del Hospital general de Leeds (Leeds, RU) se cribó para identificar 148 adenomas colorrectales anonimizados, que incluyeron 84 adenomas tubulares, 27 adenomas tubulovelloso, 5 adenomas vellosos y 32 adenomas planos. Los tejidos incorporados en parafina fijados a formalina se biopsizaron para representar cada adenoma en MMT, como se ha descrito previamente (Kononen y col. *Nat Med* 1998;4:844-7).

[0181] Los tejidos incorporados en parafina fijados en formalina de cánceres primarios de correspondencia y metástasis de múltiples fuentes se recuperaron de los archivos de Genentech. La serie comprendía 28 CCR primarios y 30 metástasis (seis mesentéricas, 21 de los ganglios linfáticos y 3 hepáticas), representando 27 pacientes. También se incluyeron nuevas metástasis hepáticas sin corresponder adicionales. Se cortaron secciones completas y se usaron para ensayos aguas abajo.

[0182] Este estudio también investigó 342 CCR del archivo de tejidos de la Universidad de Leeds, representando 330 pacientes que se sometieron a resección en el Departamento de Cirugía en el Hospital Marien (Duesseldorf, Alemania) entre enero de 1990 y diciembre de 1995. Los datos de mucosa normal y supervivencia de correspondencia estuvieron disponibles para todos los pacientes, que incluyen información sobre la reaparición de enfermedad. La mediana del tiempo de seguimiento fue 4,2 años (intervalo: 5 meses a 11,4 años). Posoperatoriamente, catorce pacientes recibieron quimioterapia, doce pacientes recibieron radioterapia y siete pacientes ambos. Ciento diez tumores (32%) fueron proximales a la flexión esplénica, la edad media en el diagnóstico fue 69 años (intervalo: 28-88 años) y 150 pacientes (45%) fueron hombres. Al final del periodo de seguimiento, la reaparición de enfermedad local se observó en 25 pacientes, metástasis distantes en 49 pacientes y 8 pacientes mostraron ambos (Grabsch y col. *Am J Clin Pathol* 2004;122:511-6). Se construyeron MMT como se ha descrito previamente (Kononen y col. *Nat Med* 1998;4:844-7).

40

Hibridación *in situ* (HIS)

[0183] Se emplearon ribosondas marcadas con ³³P para evaluar la expresión de ARNm de EphB2. Se amplificaron moldes de ADNc por reacción en cadena de la polimerasa a partir de ADNc listo para la maratón de cerebro humano completo (BD Clontech, Palo Alto, CA). Cebadores directos e inversos contuvieron sitios de iniciación de 5' T7 y T3 ARN polimerasa, respectivamente. Se diseñaron ribosondas para complementar los nucleótidos 3043-3500 de la secuencia de ARNm de la variante de transcrito 2 (acceso de GenBank NM_004442) y los nucleótidos 2972-3404 de la secuencia de ARNm de la variante de transcrito 1 (acceso de GenBank NM_017449): directo 5'-T7-GCCCTCCTGGTGCTCTATCC-3' (SEQ ID NO:15), inverso 5'-T3-TCTGTCCATCTGTCCCGTCCT-3' (SEQ ID NO:16). La transcripción *in vitro* de sondas sentido y antisentido, hibridación y revelado de secciones se llevaron a cabo como se describe en Jubb y col. *J Pathol* 2003;200:577-88. Las secciones de tejido hibridadas se revisaron por microscopía de campo brillante y oscuro en una escala de 0-3 para la intensidad máxima de expresión de EphB2 en >10% del epitelio.

55 Inmunohistoquímica (IHC)

[0184] La IHC se realizó como se describe en Jubb y col. *J Pathol* 2003;200:577-88. En resumen, la recuperación de antígeno mediada por calor se realizó sobre secciones desparafinadas (disolución de recuperación diana, DAKOCytomation, Carpintería, EE.UU.), antes del bloqueo de la biotina endógena (kit de bloqueo de avidina-biotina, Vector Labs, Burlingame, CA) e inmunoglobulinas no específicas con 10% de suero de caballo normal, según las instrucciones del fabricante. El inmunomarcado se realizó con un anticuerpo policlonal anti-EphB2 (número de catálogo AF467, R&D Systems, Mineápolis, MN) o inmunoglobulinas de cabra sin tratamiento previo (R&D Systems) a 1 µg/ml. Los inmunocomplejos se marcaron con un anticuerpo secundario anti-cabra biotilado (Vector Labs) y un complejo de avidina-biotina-peroxidasa de rábano picante (Vectastain Elite, Burlingame, CA). Los tejidos se puntuaron en una escala de 0-3 para la intensidad máxima de expresión de EphB2 en >10% del epitelio.

Las MMT de sedimentos de células se incluyeron en cada ejecución de tinción para controlar la variabilidad en la intensidad de tinción.

Análisis estadístico

5

[0185] El mismo anatomopatólogo puntuó todos los casos, cegado al desenlace clínico. La puntuación se realizó según los criterios enumerados en la Tabla 1. En todos las MMT, la puntuación del mayor núcleo de expresión ($n = 1-3$ /muestra) se usó para representar cada paciente. Los tiempos de supervivencia medios dentro de cada subgrupo se estimaron a partir de curvas de Kaplan-Meier y las razones de riesgo correspondientes para supervivencia global y sin reaparición se estimaron por modelado de ajuste de riesgos proporcionales usando el software JMP versión 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Las asociaciones estadísticas se evaluaron usando la prueba de la χ^2 al cuadrado, prueba de la t de Student, correlación por rangos de Spearman según conviniera. La significancia estadística se asumió si el valor de P fue $< 0,05$.

15 RESULTADOS EXPERIMENTALES

[0186] La expresión de EphB2 se analizó en mucosa normal, adenomas, cánceres primarios de correspondencia y metástasis, y una serie de cánceres primarios con seguimiento clínico detallado. Los objetivos de este estudio fueron investigar el impacto del pronóstico de EphB2 en cáncer colorrectal ("CCR") y examinar los niveles relativos de expresión de EphB2 a través de la secuencia de adenoma a adenocarcinoma. Los experimentos se realizaron usando los procedimientos y materiales descritos anteriormente. Los resultados de estos experimentos se ilustran en las Figuras 7-11, como se trata más adelante.

Datos de micromatrices de oligonucleótidos

25

[0187] Un análisis de la base de datos Gene Logic demostró que el colon normal tenía un nivel de expresión de EphB2 medio significativamente inferior al de los adenomas colorrectal, cánceres primarios y metástasis distantes, $P < 0,0001$ (Figura 7A). Esta tendencia se preservó en muestras microdisseccionadas por láser, $P = 0,01$ (Figura 7B). Los cánceres primarios no tuvieron una expresión media significativamente mayor que los adenomas ($P = 0,06$) o metástasis ($P = 0,48$) (Figura 7A). El perfilado de la expresión reveló que EphB2 era menos frecuente en líneas celulares de CCR, con la mayor expresión a niveles de acuerdo con colon normal (Figura 7C). Los niveles de transcrito de EphB2 y proteína EphB2 guardaron significativamente la misma relación en líneas celulares de CCR ($P < 0,0001$).

35 Localización

[0188] En intestino grueso tanto normal como neoplásico, la expresión de ARNm y proteína de EphB2 se localizó en el epitelio (Figuras 8, 9). La expresión de proteínas EphB2 fue predominantemente membranosa, con expresión citoplásmica más débil. En todas las muestras de colon normal, tanto la expresión de ARNm ($n = 47$) como de proteína ($n = 342$) fue más intensa en la base de la cripta (puntuación = 2), disminuyendo la expresión al epitelio luminal (puntuación = 0). La intensidad de expresión máxima en poblaciones de células neoplásicas fue equivalente a la expresión en la base de la cripta colónica (Figuras 8, 9). Todos los subtipos de adenomas colorrectales presentaron evidencias de expresión homogénea de EphB2, con niveles relativamente mayores en lesiones planas en comparación con polipoides (Tabla 2). La falta de una correlación con el tamaño del tumor o la gravedad de la displasia sugiere que la expresión está presente desde un estadio muy temprano en la tumorigénesis (datos no mostrados). Aunque el 82% de los CCR primarios y el 64% de las metástasis mostraron algún nivel de expresión de EphB2 en secciones completas (Figura 8), EphB2 no se expresó homogéneamente o uniformemente en todos los tumores malignos. Esto es a diferencia de lesiones adenomatosas que, cuando estuvieron presentes, expresaron EphB2 homogéneamente en toda la población de células neoplásicas. El veintitrés por ciento de todos los adenomas no expresó EphB2. La hibridación de sondas HIS sentido y la tinción de inmunoglobulinas que no recibieron tratamiento previo no superó el ruido (datos no mostrados). Estroma benigno, tejido de ganglio linfático normal y tejido hepático normal fueron uniformemente negativos para la expresión de EphB2.

Tabla 2. Intensidad de la expresión de EphB2 en diferentes subtipos histológicos de adenoma

55

Histología	Puntuación de intensidad IHC de EphB2, n (%)				P (prueba de la t frente a adenomas vellosos)
	0	1	2	3	
Adenomas planos ($n = 32$)*	2 (6)	13 (41)	11 (34)	6 (19)	0,81
Adenomas tubulares ($n = 84$)	22 (26)	35 (42)	25 (30)	2 (2)	0,10
Adenomas tubulovillosos ($n = 27$)	9(33)	10 (37)	8 (30)		0,05
Adenomas vellosos ($n = 5$)		3 (60)	1 (20)	1 (20)	

*Prueba de la t para adenomas planos frente a polipoides, $P = 0,001$

Adenomas colorrectales, cánceres primarios y metástasis

[0189] Ciento quince (77%) de los 148 adenomas fueron positivos (puntuación ≥ 1) para la expresión de EphB2. Esto no fue estadísticamente diferente de la intensidad de expresión observada en CCR primarios, $P = 0,37$ (Figura 10). La expresión de EphB2 se demostró en todos los estados de tumorigénesis colorrectal, que incluyen todas las criptas normales, 77% de adenomas, 82% de cánceres primarios y 64% de metástasis. Cuando estuvo presente, EphB2 se expresó homogéneamente en todos los adenomas. Subtipos histológicos diferentes de adenomas polipoides no mostraron diferencia estadísticamente significativa en la intensidad de expresión de EphB2 (Tabla 2), aunque la expresión fue significativamente mayor en adenomas planos ($P = 0,001$). No hubo asociaciones significativas con sitio, gravedad de displasia, frecuencia de pólipos, tamaño de pólipos o sexo del paciente (datos no mostrados). La expresión de EphB2 fue comparable en CCR primarios y metástasis, $P = 0,17$ (Figura 10). Aunque se observó expresión homogénea en adenomas, el patrón de tinción fue focal en la mayoría de las lesiones malignas, con variación considerable en la intensidad de tinción en toda la población de células neoplásicas. Una media del 25% de las células tumorales que expresaron proteína EphB2 en tumores malignos primarios y secundarios puntuaron positivo para la expresión de EphB2. Todos los subtipos de adenomas colorrectales mostraron pruebas para la expresión homogénea de EphB2, con niveles relativamente mayores en lesiones planas en comparación con polipoides (Tabla 2). La falta de una correlación con el tamaño del tumor o la gravedad de displasia sugiere que la expresión está presente desde un estadio muy temprano en la tumorigénesis.

Serie de pronóstico de CCR primarios

[0190] Trescientos veintisiete de los 330 pacientes fueron informativos de expresión de proteínas EphB2: 185 pacientes puntuaron cero, 101 pacientes puntuaron 1 y 41 pacientes puntuaron dos (ningún paciente puntuó tres en esta serie, y las puntuaciones estuvieron ausentes en tres pacientes). La HIS se realizó sobre una MMT que contenía 47 CCR: ocho pacientes puntuaron cero, 19 pacientes puntuaron uno, 18 pacientes puntuaron dos y dos pacientes puntuaron tres. Las criptas colónicas normales correspondientes fueron positivas en la base en todos los casos. Se observó una asociación significativa entre IHC de EphB2 y puntuaciones de HIS en 46 cánceres informativos de ambos, $P < 0,01$.

[0191] Los efectos de la expresión de proteínas EphB2 se incluyeron en un ajuste de riesgos proporcional para supervivencia global. Altos niveles de expresión de EphB2 se asociaron a una duración de la supervivencia media prolongada en cáncer colorrectal y una supervivencia sin reaparición media prolongada. Los pacientes cuyo tumor se tiñó 2+ para la expresión de EphB2 (frente a 0/1+) presentaron supervivencia global significativamente prolongada: la duración media de la supervivencia fue 2514 frente a 1044 días, la razón de riesgos 0,45, intervalos de confianza del 95%: 0,18-0,95 (Figura 11A). Se encontraron resultados similares en análisis de la supervivencia sin reaparición (supervivencia media 795 frente a 2233 días, HR 0,60, IC: 0,30-1,10) (Figura 11B). Las curvas de supervivencia para pacientes que puntuaron 0 ó 1 fueron solapantes. Aunque la edad media fue significativamente inferior en pacientes con alta expresión de proteínas EphB2 (65 frente a 69,3 años, $P < 0,02$) (Tabla 3), la edad no fue un factor pronóstico en esta serie (datos no mostrados). No se observaron otras asociaciones estadísticamente significativas (Tabla 2), y no hubo diferencias en la frecuencia de terapia con adyuvante recibida por los dos grupos (datos no mostrados). El impacto de la supervivencia de las variables clinicopatológicas descritas en la Tabla 2 se ha tratado previamente (Grabsch y col. Am J Clin Pathol 2004;122:511-6). En un análisis multifactorial, que incluye estadio, grado, invasión linfática e invasión de vasos sanguíneos, una puntuación de EphB2 de 2 fue un factor de pronóstico independiente significativo (HR 0,47, IC 0,18-0,99).

Tabla 3. Asociación de la expresión de EphB2 y variables clinicopatológicas en 327 pacientes con CCR

Variable	n	Puntuación de intensidad IHC de EphB2, n (%)		P
		2	0 ó 1	
Edad				
	Media	65	69,3	0,02
Sexo				
	Masculino	150	127 (44)	0,22
	Femenino	177	159 (56)	
Estadio de TNM				
	I	74	60 (21)	0,28
	II	140	126 (44)	
	III	107	95 (33)	
	IV	6	5 (2)	
Grado				
	1	4	4 (1)	0,82
	2	247	216 (76)	
	3	74	64 (22)	
	4	2	2 (1)	
Invasión linfática				
	Ausente	238	210 (73)	0,62
	Presente	89	76 (27)	

Variable	n	Puntuación de intensidad IHC de EphB2, n (%)		P
		2	0 ó 1	
Invasión de vasos sanguíneos				
Ausente	300	36 (88)	264 (92)	0,50
Presente	27	5 (12)	22 (8)	
Sitio				
Ciego, colon ascendente y transverso	109	16 (39)	93 (33)	0,16
Colon descendente y sigmoide, recto	218	25 (61)	193 (67)	

[0192] Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para los fines de claridad de entendimiento, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención, que sólo está limitada por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

Listado de secuencias

[0193]

10 <110> Genentech, Inc.

<120> PROCEDIMIENTOS DE PRONÓSTICO, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE CÁNCER

<130> P2201R1

15

<141> 05/01/2006

<150> US 60/642.164

<151> 06/01/2005

20

<160> 16

<210> 1

<211> 17

25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Glu Asn Tyr
 1 5 10 15

30

Leu Ala

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

35

<213> Mus musculus

<400> 2

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

40

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

45

<400> 3

ES 2 398 568 T3

Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 4
<211> 5
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Ser Tyr Trp Met His
1 5

10

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
15 <213> Mus musculus

<400> 5

Phe Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Asp

20

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
25

<400> 6

Arg Leu Lys Leu Leu Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 7
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <400> 7

ES 2 398 568 T3

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

<210> 8
 <211> 119
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 8

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

10

<210> 9
 <211> 1055
 15 <212> PRT

ES 2 398 568 T3

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

5

ES 2 398 568 T3

Lys Cys Pro Arg Ile Ile Gln Asn Gly Ala Ile Phe Gln Glu Thr
 200 205 210
 Leu Ser Gly Ala Glu Ser Thr Ser Leu Val Ala Ala Arg Gly Ser
 215 220 225
 Cys Ile Ala Asn Ala Glu Glu Val Asp Val Pro Ile Lys Leu Tyr
 230 235 240
 Cys Asn Gly Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Arg Cys Met
 245 250 255
 Cys Lys Ala Gly Phe Glu Ala Val Glu Asn Gly Thr Val Cys Arg
 260 265 270
 Gly Cys Pro Ser Gly Thr Phe Lys Ala Asn Gln Gly Asp Glu Ala
 275 280 285
 Cys Thr His Cys Pro Ile Asn Ser Arg Thr Thr Ser Glu Gly Ala
 290 295 300
 Thr Asn Cys Val Cys Arg Asn Gly Tyr Tyr Arg Ala Asp Leu Asp
 305 310 315
 Pro Leu Asp Met Pro Cys Thr Thr Ile Pro Ser Ala Pro Gln Ala
 320 325 330
 Val Ile Ser Ser Val Asn Glu Thr Ser Leu Met Leu Glu Trp Thr
 335 340 345
 Pro Pro Arg Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Leu Val Tyr Asn Ile
 350 355 360
 Ile Cys Lys Ser Cys Gly Ser Gly Arg Gly Ala Cys Thr Arg Cys
 365 370 375
 Gly Asp Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Gln Leu Gly Leu Thr Glu
 380 385 390
 Pro Arg Ile Tyr Ile Ser Asp Leu Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr
 395 400 405
 Phe Glu Ile Gln Ala Val Asn Gly Val Thr Asp Gln Ser Pro Phe
 410 415 420
 Ser Pro Gln Phe Ala Ser Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala
 425 430 435
 Pro Ser Ala Val Ser Ile Met His Gln Val Ser Arg Thr Val Asp
 440 445 450
 Ser Ile Thr Leu Ser Trp Ser Gln Pro Asp Gln Pro Asn Gly Val
 455 460 465
 Ile Leu Asp Tyr Glu Leu Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu Leu Ser Glu
 470 475 480
 Tyr Asn Ala Thr Ala Ile Lys Ser Pro Thr Asn Thr Val Thr Val
 485 490 495

ES 2 398 568 T3

Gln Gly Leu Lys Ala Gly Ala Ile Tyr Val Phe Gln Val Arg Ala
500 505 510

Arg Thr Val Ala Gly Tyr Gly Arg Tyr Ser Gly Lys Met Tyr Phe
515 520 525

Gln Thr Met Thr Glu Ala Glu Tyr Gln Thr Ser Ile Gln Glu Lys
530 535 540

Leu Pro Leu Ile Ile Gly Ser Ser Ala Ala Gly Leu Val Phe Leu
545 550 555

Ile Ala Val Val Val Ile Ala Ile Val Cys Asn Arg Arg Gly Phe
560 565 570

Glu Arg Ala Asp Ser Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Gln His Tyr Thr
575 580 585

Ser Gly His Met Thr Pro Gly Met Lys Ile Tyr Ile Asp Pro Phe
590 595 600

Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu
605 610 615

Ile Asp Ile Ser Cys Val Lys Ile Glu Gln Val Ile Gly Ala Gly
620 625 630

Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly His Leu Lys Leu Pro Gly Lys
635 640 645

Arg Glu Ile Phe Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ser Gly Tyr Thr
650 655 660

Glu Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser Ile Met Gly
665 670 675

Gln Phe Asp His Pro Asn Val Ile His Leu Glu Gly Val Val Thr
680 685 690

Lys Ser Thr Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Phe Met Glu Asn Gly
695 700 705

Ser Leu Asp Ser Phe Leu Arg Gln Asn Asp Gly Gln Phe Thr Val
710 715 720

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys
725 730 735

Tyr Leu Ala Asp Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg
740 745 750

Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe
755 760 765

Gly Leu Ser Arg Phe Leu Glu Asp Asp Thr Ser Asp Pro Thr Tyr
770 775 780

Thr Ser Ala Leu Gly Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro
785 790 795

ES 2 398 568 T3

Glu Ala Ile Gln Tyr Arg Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp
800 805 810

Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg
815 820 825

Pro Tyr Trp Asp Met Thr Asn Gln Asp Val Ile Asn Ala Ile Glu
830 835 840

Gln Asp Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp Cys Pro Ser Ala Leu
845 850 855

His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Asp Arg Asn His Arg
860 865 870

Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Thr Leu Asp Lys Met Ile Arg
875 880 885

Asn Pro Asn Ser Leu Lys Ala Met Ala Pro Leu Ser Ser Gly Ile
890 895 900

Asn Leu Pro Leu Leu Asp Arg Thr Ile Pro Asp Tyr Thr Ser Phe
905 910 915

Asn Thr Val Asp Glu Trp Leu Glu Ala Ile Lys Met Gly Gln Tyr
920 925 930

Lys Glu Ser Phe Ala Asn Ala Gly Phe Thr Ser Phe Asp Val Val
935 940 945

Ser Gln Met Met Met Glu Asp Ile Leu Arg Val Gly Val Thr Leu
950 955 960

Ala Gly His Gln Lys Lys Ile Leu Asn Ser Ile Gln Val Met Arg
965 970 975

Ala Gln Met Asn Gln Ile Gln Ser Val Glu Gly Gln Pro Leu Ala
980 985 990

Arg Arg Pro Arg Ala Thr Gly Arg Thr Lys Arg Cys Gln Pro Arg
995 1000 1005

Asp Val Thr Lys Lys Thr Cys Asn Ser Asn Asp Gly Lys Lys Lys
1010 1015 1020

Gly Met Gly Lys Lys Lys Thr Asp Pro Gly Arg Gly Arg Glu Ile
1025 1030 1035

Gln Gly Ile Phe Phe Lys Glu Asp Ser His Lys Glu Ser Asn Asp
1040 1045 1050

Cys Ser Cys Gly Gly
1055

<210> 10
 <211> 4641
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10

gccccgggaa ggcagccat ggctctgcg aggctggggg ccgcgctgct 50
gctgctgccg ctgctcgccg ccgtggaaga aacgctaata gactccacta 100
cagcgactgc tgagctgggc tggatggtgc atcctccatc aggggtggaa 150
gaggtgagtg gctacgatga gaacatgaac acgatccgca cgtaccaggt 200
gtgcaacgtg tttgagtcaa gccagaacaa ctggctacgg accaagtta 250
tccggcgccg tggcgccac cgcatccacg tggagatgaa gttttcgggtg 300
cgtgactgca gcagcatccc cagcgtgcct ggctcctgca aggagacctt 350
caacctctat tactatgagg ctgactttga ctcgccacc aagaccttcc 400
ccaactgat ggagaatcca tgggtgaagg tggataccat tgcagccgac 450
gagagcttct cccaggtgga cctgggtggc cgcgctatga aatcaaac 500
cgaggtgcbg agcttcggac ctgtgtcccg cagcggcttc tacctggcct 550
tccaggacta tggcggctgc atgtccctca tcgccgtgcb tgtcttctac 600
cgcaagtgcc cccgcatcat ccagaatggc gccatcttcc aggaaacctt 650
gtcgggggct gagagcacat cgctggtggc tgcccggggc agctgcatcg 700
ccaatgcbga agaggtgat gtacccatca agctctactg taacggggac 750
ggcgagtggc tgggtgccat cggcgctgc atgtgcaaag caggcttcga 800
ggcgttgag aatggcaccg tctgccgagg ttgtccatct gggactttca 850
aggccaacca aggggatgag gcctgtaccc actgtcccat caacagccgg 900
accacttctg aaggggccac caactgtgtc tgccgcaatg gctactacag 950
agcagacctg gaccccctgg acatgccctg cacaaccatc ccctccgcb 1000
cccaggctgt gatttccagt gtcaatgaga cctccctcat gctggagtgg 1050
accctcccc gcgactcgg aggccgagag gacctcgtct acaacatcat 1100
ctgcaagagc tgtggctcgg gccggggtgc ctgcaccgcb tgcggggaca 1150
atgtacagta cgcaccagcb cagctaggcc tgaccgagcc acgcatttac 1200
atcagtgacc tgctggccca caccagtac accttcgaga tccaggtgt 1250
gaacggcgtt actgaccaga gcccttctc gcctcagttc gcctctgtga 1300
acatcaccac caaccaggca gctccatcgg cagtgtccat catgcatcag 1350
gtgagccgca ccgtggacag cattaccctg tcgtggtccc agccggacca 1400
gcccaatggc gtgatcctgg actatgagct gcagtactat gagaaggagc 1450
tcagtgagta caacgccaca gccataaaaa gcccaccaa cacggtcacc 1500
gtgcagggcc tcaaagccgg cgcctctat gtcttccagg tgcgggcagc 1550

ES 2 398 568 T3

caccgtygca ggcacgygc gctacagcgg caagatgtac ttccagacca 1600
 tgacagaagc cgagtaccag acaagcatcc aggagaagtt gccactcadc 1650
 atcggctcct cggccgctgg cctggtcttc ctcatgtctg tggttgtcat 1700
 cgccatcgtg tgtaacagac gggggtttga gcgtgctgac tcggagtaca 1750
 cggacaagct gcaacactac accagtggcc acatgacccc aggcatgaag 1800
 atctacatcg atcctttcac ctacgaggac cccaacgagg cagtgcggga 1850
 gtttgccaag gaaattgaca tctcctgtgt caaaattgag caggatgatc 1900
 gagcagggga gtttggcgag gtctgcagtg gccacctgaa gctgccaggc 1950
 aagagagaga tctttgtggc catcaagacg ctcaagtcgg gctacacgga 2000
 gaagcagcgc cgggacttcc tgagcgaagc ctccatcatg ggccagtccg 2050
 accatoccaa cgtcatccac ctggaggggtg tcgtgaccaa gagcacacct 2100
 gtgatgatca tcaccgagtt catggagaat ggctccctgg actcctttct 2150
 ccggcaaaac gatgggcagt tcacagtcac ccagctgggtg ggcattgctc 2200
 ggggcatcgc agctggcatg aagtacctgg cagacatgaa ctatgttcac 2250
 cgtgacctgg ctgcccgaac catcctcgtc aacagcaacc tggctctgca 2300
 ggtgtcggac tttgggctct cacgctttct agaggacgat acctcagacc 2350
 ccacctacac cagtgccttg ggcggaaaga tccccatccg ctggacagcc 2400
 ccggaagcca tccagtaccg gaagttcacc tcggccagtg atgtgtggag 2450
 ctacggcatt gtcatgtggg aggtgatgtc ctatggggag cggccctact 2500
 gggacatgac caaccaggat gtaatcaatg ccattgagca ggactatcgg 2550
 ctgccaccgc ccatggactg cccgagcggc ctgcaccaac tcatgctgga 2600
 ctgttggcag aaggaccgca accaccggcc caagtccggc caaattgtca 2650
 acacgctaga caagatgatc cgcaatccca acagcctcaa agccatggcg 2700
 cccctctcct ctggcatcaa cctgccgctg ctggaccgca cgatccccga 2750
 ctacaccagc tttaacacgg tggacgagtg gctggaggcc atcaagatgg 2800
 ggaggtacaa ggagagcttc gccaatgccg gcttcacctc ctttgacgtc 2850
 gtgtctcaga tgatgatgga ggacattctc cgggttgggg tcactttggc 2900
 tggccaccag aaaaaaatcc tgaacagtat ccaggtgatg cgggcccaga 2950
 tgaaccagat tcagtctgtg gagggccagc cactcggcag gagggcacgg 3000
 gccacgggaa gaaccaagcg gtgccagcca cgagacgtca ccaagaaaac 3050
 atgcaactca aacgacggaa aaaaaaggg aatgggaaaa aagaaaacag 3100

ES 2 398 568 T3

atcctgggag ggggcgggaa atacaaggaa tattttttaa agaggattct 3150
 cataaggaaa gcaatgactg ttcttgccgg ggataaaaaa gggcttggga 3200
 gattcatgcg atgtgtccaa tcggagacaa aagcagtttc tctccaactc 3250
 cctctgggaa ggtgacctgg ccagagccaa gaaacacttt cagaaaaaca 3300
 aatgtgaagg ggagagacag gggccgccct tggctcctgt ccctgctgct 3350
 cctctaggcc tcaactcaaca accaagcgcc tggaggacgg gacagatgga 3400
 cagacagcca ccctgagaac ccctctggga aaatctatc ctgccaccac 3450
 tgggcaaaca gaagaatfff tctgtctttg gagagtatff tagaaactcc 3500
 aatgaaagac actgtttctc ctgttggtc acagggctga aaggggctff 3550
 tgtcctcctg ggtcagggag aacgcgggga cccagaaaag gtcagccttc 3600
 ctgaggatgg gcaaccccca ggtctgcagc tccaggtaca tatcacgcbc 3650
 acagcctggc agcctggccc tcctgggtgc cactcccgcc agcccctgcc 3700
 tcgaggactg atactgcagt gactgccgtc agctccgact gccgctgaga 3750
 agggttgatc ctgcatctgg gtttgtttac agcaattcct ggactcgggg 3800
 gtatfffgtt cacaggggtg ttttggttta gggggtttgt ttgttgggtt 3850
 gttttttgtt ttttggtttt ttttaatgac aatgaaatga cactttgaca 3900
 tttcctacct tttgaggact tgatccttct ccaggaagaa ggtgctttct 3950
 gcttactgac ttaggcaata caccaagggc gagatffat atgcacatff 4000
 ctggatfff ttatacgggt ttcaattgaca ctcttcctc ctcccactg 4050
 ccaccaggcc tcaccaaagc ccaactgccat ggggccatct gggccattca 4100
 gagactggag tgagatffg gtgtggaggg ggaggcgcca aggtggagga 4150
 gcttcccact ccaggactgt tgatgaaagg gacagattga ggaggaagtg 4200
 ggctctgagg ctgcagggct ggaagtctt gccacttcc cactctcctg 4250
 ccccaatcta tctagtactt cccaggcaaa taggccctt tgaggctcct 4300
 gagtgcctc agatgggtcaa aaccagttt tcctctggg agcctaaacc 4350
 aggctgcatc ggaggccagg acccgatca ttcactgtga taccctgcc 4400
 tcagaggggt gcgctcagag acacgggcaa gcatgcctct tccttcct 4450
 ggagagaaaag tgtgtgattt ctctcccacc tccttcccc caccagacct 4500
 ttgctgggcc taaaggctt ggccatgggg acgccctcag tctaggatc 4550
 tggccacaga ctccctcctg tgaaccaaca cagacacca agcagagcaa 4600

 tcagttagtg aattgaaatg aaataaacgc tttagttata a 4641

<210> 11
 5 <211> 987
 <212> PRT

ES 2 398 568 T3

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met	Ala	Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	1	5	10	15
Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Thr	Leu	Met	Asp	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr	20	25	30	
Ala	Glu	Leu	Gly	Trp	Met	Val	His	Pro	Pro	Ser	Gly	Trp	Glu	Glu	35	40	45	
Val	Ser	Gly	Tyr	Asp	Glu	Asn	Met	Asn	Thr	Ile	Arg	Thr	Tyr	Gln	50	55	60	
Val	Cys	Asn	Val	Phe	Glu	Ser	Ser	Gln	Asn	Asn	Trp	Leu	Arg	Thr	65	70	75	
Lys	Phe	Ile	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	His	Arg	Ile	His	Val	Glu	Met	80	85	90	
Lys	Phe	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ser	Ser	Ile	Pro	Ser	Val	Pro	Gly	95	100	105	
Ser	Cys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Asp	Phe	110	115	120	
Asp	Ser	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	Trp	Met	Glu	Asn	Pro	Trp	125	130	135	
Val	Lys	Val	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Ser	Phe	Ser	Gln	Val	140	145	150	
Asp	Leu	Gly	Gly	Arg	Val	Met	Lys	Ile	Asn	Thr	Glu	Val	Arg	Ser	155	160	165	
Phe	Gly	Pro	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu	Ala	Phe	Gln	Asp	170	175	180	
Tyr	Gly	Gly	Cys	Met	Ser	Leu	Ile	Ala	Val	Arg	Val	Phe	Tyr	Arg	185	190	195	
Lys	Cys	Pro	Arg	Ile	Ile	Gln	Asn	Gly	Ala	Ile	Phe	Gln	Glu	Thr	200	205	210	
Leu	Ser	Gly	Ala	Glu	Ser	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Ser	215	220	225	
Cys	Ile	Ala	Asn	Ala	Glu	Glu	Val	Asp	Val	Pro	Ile	Lys	Leu	Tyr	230	235	240	
Cys	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Arg	Cys	Met	245	250	255	
Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Ala	Val	Glu	Asn	Gly	Thr	Val	Cys	Arg	260	265	270	

ES 2 398 568 T3

Gly Cys Pro Ser Gly Thr Phe Lys Ala Asn Gln Gly Asp Glu Ala
 275 280 285
 Cys Thr His Cys Pro Ile Asn Ser Arg Thr Thr Ser Glu Gly Ala
 290 295 300
 Thr Asn Cys Val Cys Arg Asn Gly Tyr Tyr Arg Ala Asp Leu Asp
 305 310 315
 Pro Leu Asp Met Pro Cys Thr Thr Ile Pro Ser Ala Pro Gln Ala
 320 325 330
 Val Ile Ser Ser Val Asn Glu Thr Ser Leu Met Leu Glu Trp Thr
 335 340 345
 Pro Pro Arg Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Leu Val Tyr Asn Ile
 350 355 360
 Ile Cys Lys Ser Cys Gly Ser Gly Arg Gly Ala Cys Thr Arg Cys
 365 370 375
 Gly Asp Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Gln Leu Gly Leu Thr Glu
 380 385 390
 Pro Arg Ile Tyr Ile Ser Asp Leu Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr
 395 400 405
 Phe Glu Ile Gln Ala Val Asn Gly Val Thr Asp Gln Ser Pro Phe
 410 415 420
 Ser Pro Gln Phe Ala Ser Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala
 425 430 435
 Pro Ser Ala Val Ser Ile Met His Gln Val Ser Arg Thr Val Asp
 440 445 450
 Ser Ile Thr Leu Ser Trp Ser Gln Pro Asp Gln Pro Asn Gly Val
 455 460 465
 Ile Leu Asp Tyr Glu Leu Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu Leu Ser Glu
 470 475 480
 Tyr Asn Ala Thr Ala Ile Lys Ser Pro Thr Asn Thr Val Thr Val
 485 490 495
 Gln Gly Leu Lys Ala Gly Ala Ile Tyr Val Phe Gln Val Arg Ala
 500 505 510
 Arg Thr Val Ala Gly Tyr Gly Arg Tyr Ser Gly Lys Met Tyr Phe
 515 520 525
 Gln Thr Met Thr Glu Ala Glu Tyr Gln Thr Ser Ile Gln Glu Lys
 530 535 540
 Leu Pro Leu Ile Ile Gly Ser Ser Ala Ala Gly Leu Val Phe Leu
 545 550 555
 Ile Ala Val Val Val Ile Ala Ile Val Cys Asn Arg Arg Arg Gly
 560 565 570

ES 2 398 568 T3

Phe Glu Arg Ala Asp Ser Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Gln His Tyr
 575 580 585
 Thr Ser Gly His Met Thr Pro Gly Met Lys Ile Tyr Ile Asp Pro
 590 595 600
 Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu Phe Ala Lys
 605 610 615
 Glu Ile Asp Ile Ser Cys Val Lys Ile Glu Gln Val Ile Gly Ala
 620 625 630
 Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly His Leu Lys Leu Pro Gly
 635 640 645
 Lys Arg Glu Ile Phe Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ser Gly Tyr
 650 655 660
 Thr Glu Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser Ile Met
 665 670 675
 Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Val Ile His Leu Glu Gly Val Val
 680 685 690
 Thr Lys Ser Thr Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Phe Met Glu Asn
 695 700 705
 Gly Ser Leu Asp Ser Phe Leu Arg Gln Asn Asp Gly Gln Phe Thr
 710 715 720
 Val Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met
 725 730 735
 Lys Tyr Leu Ala Asp Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 740 745 750
 Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp
 755 760 765
 Phe Gly Leu Ser Arg Phe Leu Glu Asp Asp Thr Ser Asp Pro Thr
 770 775 780
 Tyr Thr Ser Ala Leu Gly Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala
 785 790 795
 Pro Glu Ala Ile Gln Tyr Arg Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val
 800 805 810
 Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met Ser Tyr Gly Glu
 815 820 825
 Arg Pro Tyr Trp Asp Met Thr Asn Gln Asp Val Ile Asn Ala Ile
 830 835 840
 Glu Gln Asp Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp Cys Pro Ser Ala
 845 850 855
 Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Asp Arg Asn His
 860 865 870

ES 2 398 568 T3

Arg	Pro	Lys	Phe	Gly	Gln	Ile	Val	Asn	Thr	Leu	Asp	Lys	Met	Ile
				875					880					885
Arg	Asn	Pro	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Met	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Gly
				890					895					900
Ile	Asn	Leu	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Thr	Ile	Pro	Asp	Tyr	Thr	Ser
				905					910					915
Phe	Asn	Thr	Val	Asp	Glu	Trp	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Met	Gly	Gln
				920					925					930
Tyr	Lys	Glu	Ser	Phe	Ala	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe	Asp	Val
				935					940					945
Val	Ser	Gln	Met	Met	Met	Glu	Asp	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Val	Thr
				950					955					960
Leu	Ala	Gly	His	Gln	Lys	Lys	Ile	Leu	Asn	Ser	Ile	Gln	Val	Met
				965					970					975
Arg	Ala	Gln	Met	Asn	Gln	Ile	Gln	Ser	Val	Glu	Val			
				980					985					

<210> 12
 <211> 4737
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

ES 2 398 568 T3

gccccgggaa gcgcagccat ggctctgcgg aggctggggg ccgcgctgct 50
getgctgccg ctgctcgccg ccgtggaaga aacgctaata gactccacta 100
cagcgactgc tgagctgggc tggatggtgc atcctccatc aggggtgggaa 150
gaggtgagtg gctacgatga gaacatgaac acgatccgca cgtaccaggt 200
gtgcaacgtg tttgagtcaa gccagaacaa ctggctacgg accaagttaa 250
tccggcgccg tggcgccac cgcatecacg tggagatgaa gttttcgggtg 300
cgtgactgca gcagcatccc cagcgtgcct ggctcctgca aggagacctt 350
caacctctat tactatgagg ctgactttga ctcggccacc aagaccttcc 400
ccaactggat ggagaatcca tgggtgaagg tggataccat tgcagccgac 450
gagagcttct cccaggtgga cctgggtggc cgcgtcatga aatcaacac 500
cgaggtgcgg agcttcggac ctgtgtcccg cagcggcttc tacctggcct 550
tccaggacta tggcggctgc atgtccctca tcgccgtgcy tgtcttctac 600
cgcaagtgcc cccgcatcat ccagaatggc gccatcttcc aggaaaccct 650
gtcgggggct gagagcacat cgctggtggc tgccccgggc agctgcatcg 700
ccaatgcgga agaggtggat gtacccatca agctctactg taacggggac 750
ggcgagtggc tggtgccat cgggcgctgc atgtgcaaag caggcttcga 800

ES 2 398 568 T3

ggccgtgag aatggcaccg tctgccgagg ttgtccatct gggactttca 850
 aggccaacca aggggatgag gcctgtacco actgtcccat caacagccgg 900
 accacttctg aaggggccac caactgtgtc tgccgcaatg gctactacag 950
 agcagacctg gaccccctgg acatgccttg cacaaccatc cctccgggc 1000
 cccaggctgt gatttccagt gtcaatgaga cctccctcat gctggagtgg 1050
 accctcccc gcgactcggg aggccgagag gacctcgtct acaacatcat 1100
 ctgcaagagc tgtggctcgg gccggggtgc ctgcacccgc tgcggggaca 1150
 atgtacagta cgcaccacgc cagctaggcc tgaccgagcc acgcatttac 1200
 atcagtgacc tgctggcca caccagtac accttcgaga tccaggctgt 1250
 gaacggcggt actgaccaga gcccttctc gcctcagttc gcctctgtga 1300
 acatcaccac caaccaggca gctccatcgg cagtgtccat catgcatcag 1350
 gtgagccgca ccgtggacag cattaccctg tcgtgggtccc agccggacca 1400
 gcccaatggc gtgatcctgg actatgagct gcagtactat gagaaggagc 1450
 tcagtgagta caacgccaca gccataaaaa gcccaccaa cacggtcacc 1500
 gtgcagggcc tcaaagccgg cgccatctat gtcttcagg tgcgggcacg 1550
 caccgtggca ggctacgggc gctacagcgg caagatgtac ttccagacca 1600
 tgacagaagc cgagtaccag acaagcatcc aggagaagtt gccactcatc 1650
 atcggctcct cggccgctgg cctggtcttc ctcatgtctg tggttgtcat 1700
 cgccatcgtg tgtaacagaa gacgggggtt tgagcgtgct gactcggagt 1750
 acacggacia gctgcaacac tacaccagtg gccacatgac cccaggcatg 1800
 aagatctaca tcgatccttt cacctacgag gacccaacg aggcagtgcg 1850
 ggagtttgcc aaggaaattg acatctcctg tgtcaaaatt gagcaggtga 1900
 tcggagcagg ggagtttggc gaggtctgca gtggccacct gaagctgcca 1950
 ggcaagagag agatctttgt ggccatcaag acgctcaagt cgggctacac 2000
 ggagaagcag cgccgggact tcctgagcga agcctccatc atgggcccagt 2050
 tcgaccatcc caacgtcatc cacctggagg gtgtcgtgac caagagcaca 2100
 cctgtgatga tcatcaccga gttcatggag aatggctccc tggactcctt 2150
 tctccggcaa aacgatgggc agttcacagt catccagctg gtgggcatgc 2200
 ttcggggcat cgcagctggc atgaagtacc tggcagacat gaactatggt 2250
 caccgtgacc tggctgcccg caacatcctc gtcaacagca acctggtctg 2300

ES 2 398 568 T3

caaggtgtcg gactttgggc tctcacgctt tctagaggac gatacctcag 2350
 accccaccta caccagtgcc ctgggcggaa agatcccat ccgctggaca 2400
 gccccggaag ccatccagta ccggaagttc acctcggcca gtgatgtgtg 2450
 gagctacggc attgtcatgt gggaggtgat gtcctatggg gagcggcct 2500
 actgggacat gaccaaccag gatgtaatca atgccattga gcaggactat 2550
 cggctgccac cgcccatgga ctgcccgagc gccctgcacc aactcatgct 2600
 ggactgttgg cagaaggacc gcaaccaccg gcccaagttc ggccaaattg 2650
 tcaacacgct agacaagatg atccgcaatc ccaacagcct caaagccatg 2700
 gcgcccctct cctctggcat caacctgccg ctgctggacc gcacgatccc 2750
 cgactacacc agctttaaca cggaggacga gtggctggag gccatcaaga 2800
 tggggcagta caaggagagc ttogccaatg ccggcttcac ctcccttgac 2850
 gtogtgtctc agatgatgat ggaggacatt ctccgggttg gggtcacttt 2900
 ggctggccac cagaaaaaaaa tcctgaacag tatccaggtg atgoggggcg 2950
 agatgaacca gattcagtct gtggaggttt gacattcacc tgccctggct 3000
 cacctcttcc tccaagcccc gcccctctg cccacgtgc cgccctcct 3050
 ggtgctctat ccaactgcagg gccagccact cgccaggagg ccaogggcca 3100
 cgggaagaac caagcgggtgc cagccacgag acgtcaccaa gaaaacatgc 3150
 aactcaaacy acgaaaaaaaa aaagggaaatg ggaaaaaaga aaacagatcc 3200
 tgggaggggg cgggaaatac aaggaatatt ttttaaagag gattctcata 3250
 aggaaagcaa tgactgttct tgccgggggat aaaaaagggc ttgggagatt 3300
 catgcgatgt gtccaatcgg agacaaaagc agtttctctc caactccctc 3350
 tgggaaggtg acctggccag agccaagaaa cactttcaga aaaacaaatg 3400
 tgaaggggag agacaggggc cgcccttggc tcctgtccct gctgctctc 3450
 taggcctcac tcaacaacca agcgcctgga ggacgggaca gatggacaga 3500
 cagccaccct gagaaccct ctgggaaaat ctattcctgc caccactggg 3550
 caaacagaag aatttttctg tctttggaga gtattttaga aactccaatg 3600
 aaagacactg tttctcctgt tggctcacag ggctgaaagg ggcttttgtc 3650
 ctcttgggtc agggagaacy cggggacccc agaaaggtca gccttctga 3700
 ggatgggcaa ccccaggtc tgcagctcca ggtacatata acgcgcacag 3750
 cctggcagcc tggccctcct ggtgccact cccgccagcc cctgcctcga 3800
 ggactgatac tgcaagtact gccgtcagct ccgactgccg ctgagaaggg 3850

ES 2 398 568 T3

ttgatcctgc atctgggttt gtttacagca attcctggac tcgggggtat 3900
 tttggtcaca ggggtggtttt ggtttagggg gtttgtttgt tgggttgttt 3950
 tttgtttttt ggtttttttt aatgacaatg aagtgacact ttgacatttc 4000
 ctaccttttg aggacttgat ccttctccag gaagaagggtg ctttctgctt 4050
 actgacttag gcaatacacc aagggcgaga ttttatatgc acatttctgg 4100
 atttttttat acggttttca ttgacactct tccctcctcc cacctgccac 4150
 caggcctcac caaagcccac tgccatgggg ccatctgggc cattcagaga 4200
 ctggagtgag atttgggtgt ggagggggag gcgccaaggt ggaggagctt 4250
 cccactccag gactgttgat gaaagggaca gattgaggag gaagtgggct 4300
 ctgaggctgc agggctggaa gtccttgccc acttcccact ctctgcccc 4350
 aatctatcta gtacttccca ggcaaatagg cccctttgag gctcctgagt 4400
 gccctcagat ggtcaaaacc cagttttccc tctgggagcc taaaccaggc 4450
 tgcacgggag gccaggaccc ggatcattca ctgtgatacc ctgccctcca 4500
 gagggtgctc tcagagacac gggcaagcat gcctcttccc ttccctggag 4550
 agaaagtgtg tgatttctct cccacctcct tccccccacc agacctttgc 4600
 tgggcctaaa ggtcttgccc atggggacgc cctcagtcta gggatctggc 4650
 cacagactcc ctctgtgaa ccaacacaga cacccaagca gagcaatcag 4700
 ttagtgaatt gaatggaaat aaacgcttta gttataa 4737

<210> 13
 <211> 986
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

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

ES 2 398 568 T3

Lys Phe Ser Val Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro Ser Val Pro Gly
 95 100 105
 Ser Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ala Asp Phe
 110 115 120
 Asp Ser Ala Thr Lys Thr Phe Pro Asn Trp Met Glu Asn Pro Trp
 125 130 135
 Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Ser Gln Val
 140 145 150
 Asp Leu Gly Gly Arg Val Met Lys Ile Asn Thr Glu Val Arg Ser
 155 160 165
 Phe Gly Pro Val Ser Arg Ser Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp
 170 175 180
 Tyr Gly Gly Cys Met Ser Leu Ile Ala Val Arg Val Phe Tyr Arg
 185 190 195
 Lys Cys Pro Arg Ile Ile Gln Asn Gly Ala Ile Phe Gln Glu Thr
 200 205 210
 Leu Ser Gly Ala Glu Ser Thr Ser Leu Val Ala Ala Arg Gly Ser
 215 220 225
 Cys Ile Ala Asn Ala Glu Glu Val Asp Val Pro Ile Lys Leu Tyr
 230 235 240
 Cys Asn Gly Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Arg Cys Met
 245 250 255
 Cys Lys Ala Gly Phe Glu Ala Val Glu Asn Gly Thr Val Cys Arg
 260 265 270
 Gly Cys Pro Ser Gly Thr Phe Lys Ala Asn Gln Gly Asp Glu Ala
 275 280 285
 Cys Thr His Cys Pro Ile Asn Ser Arg Thr Thr Ser Glu Gly Ala
 290 295 300
 Thr Asn Cys Val Cys Arg Asn Gly Tyr Tyr Arg Ala Asp Leu Asp
 305 310 315
 Pro Leu Asp Met Pro Cys Thr Thr Ile Pro Ser Ala Pro Gln Ala
 320 325 330
 Val Ile Ser Ser Val Asn Glu Thr Ser Leu Met Leu Glu Trp Thr
 335 340 345
 Pro Pro Arg Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Leu Val Tyr Asn Ile
 350 355 360
 Ile Cys Lys Ser Cys Gly Ser Gly Arg Gly Ala Cys Thr Arg Cys
 365 370 375
 Gly Asp Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Gln Leu Gly Leu Thr Glu
 380 385 390

ES 2 398 568 T3

Pro	Arg	Ile	Tyr	Ile	Ser	Asp	Leu	Leu	Ala	His	Thr	Gln	Tyr	Thr
				395					400					405
Phe	Glu	Ile	Gln	Ala	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Asp	Gln	Ser	Pro	Phe
				410					415					420
Ser	Pro	Gln	Phe	Ala	Ser	Val	Asn	Ile	Thr	Thr	Asn	Gln	Ala	Ala
				425					430					435
Pro	Ser	Ala	Val	Ser	Ile	Met	His	Gln	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Asp
				440					445					450
Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Trp	Ser	Gln	Pro	Asp	Gln	Pro	Asn	Gly	Val
				455					460					465
Ile	Leu	Asp	Tyr	Glu	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Glu	Leu	Ser	Glu
				470					475					480
Tyr	Asn	Ala	Thr	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro	Thr	Asn	Thr	Val	Thr	Val
				485					490					495
Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Ala	Ile	Tyr	Val	Phe	Gln	Val	Arg	Ala
				500					505					510
Arg	Thr	Val	Ala	Gly	Tyr	Gly	Arg	Tyr	Ser	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe
				515					520					525
Gln	Thr	Met	Thr	Glu	Ala	Glu	Tyr	Gln	Thr	Ser	Ile	Gln	Glu	Lys
				530					535					540
Leu	Pro	Leu	Ile	Ile	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Phe	Leu
				545					550					555
Ile	Ala	Val	Val	Val	Ile	Ala	Ile	Val	Cys	Asn	Arg	Arg	Gly	Phe
				560					565					570
Glu	Arg	Ala	Asp	Ser	Glu	Tyr	Thr	Asp	Lys	Leu	Gln	His	Tyr	Thr
				575					580					585
Ser	Gly	His	Met	Thr	Pro	Gly	Met	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asp	Pro	Phe
				590					595					600
Thr	Tyr	Glu	Asp	Pro	Asn	Glu	Ala	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Lys	Glu
				605					610					615
Ile	Asp	Ile	Ser	Cys	Val	Lys	Ile	Glu	Gln	Val	Ile	Gly	Ala	Gly
				620					625					630
Glu	Phe	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Leu	Pro	Gly	Lys
				635					640					645
Arg	Glu	Ile	Phe	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Ser	Gly	Tyr	Thr
				650					655					660
Glu	Lys	Gln	Arg	Arg	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Ile	Met	Gly
				665					670					675
Gln	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Val	Ile	His	Leu	Glu	Gly	Val	Val	Thr
				680					685					690

ES 2 398 568 T3

Lys Ser Thr Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Phe Met Glu Asn Gly
695 700 705

Ser Leu Asp Ser Phe Leu Arg Gln Asn Asp Gly Gln Phe Thr Val
710 715 720

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys
725 730 735

Tyr Leu Ala Asp Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg
740 745 750

Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe
755 760 765

Gly Leu Ser Arg Phe Leu Glu Asp Asp Thr Ser Asp Pro Thr Tyr
770 775 780

Thr Ser Ala Leu Gly Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro
785 790 795

Glu Ala Ile Gln Tyr Arg Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp
800 805 810

Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg
815 820 825

Pro Tyr Trp Asp Met Thr Asn Gln Asp Val Ile Asn Ala Ile Glu
830 835 840

Gln Asp Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp Cys Pro Ser Ala Leu
845 850 855

His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Asp Arg Asn His Arg
860 865 870

Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Thr Leu Asp Lys Met Ile Arg
875 880 885

Asn Pro Asn Ser Leu Lys Ala Met Ala Pro Leu Ser Ser Gly Ile
890 895 900

Asn Leu Pro Leu Leu Asp Arg Thr Ile Pro Asp Tyr Thr Ser Phe
905 910 915

Asn Thr Val Asp Glu Trp Leu Glu Ala Ile Lys Met Gly Gln Tyr
920 925 930

Lys Glu Ser Phe Ala Asn Ala Gly Phe Thr Ser Phe Asp Val Val
935 940 945

Ser Gln Met Met Met Glu Asp Ile Leu Arg Val Gly Val Thr Leu
950 955 960

Ala Gly His Gln Lys Lys Ile Leu Asn Ser Ile Gln Val Met Arg
965 970 975

Ala Gln Met Asn Gln Ile Gln Ser Val Glu Val
980 985

<210> 14
 <211> 3800
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 398 568 T3

cggaagcgc agccatggct ctgcggaggc tgggggcccgc gctgctgctg 50
 ctgccgctgc tcgccgcgt ggaagaaacg ctaatggact ccactacagc 100
 gactgctgag ctgggctgga tgggtgcatcc tccatcaggg tgggaagagg 150
 tgagtggcta cgatgagaac atgaacacga tccgcacgta ccaggtgtgc 200
 aacgtgtttg agtcaagcca gaacaactgg ctacggacca agtttatccg 250
 ggcgcgtggc gcccaaccgca tccacgtgga gatgaagttt tcggtgctg 300
 actgcagcag catccccagc gtgcctggct cctgcaagga gaccttcaac 350
 ctctattact atgaggctga ctttgactcg gccaccaaga ccttcccca 400
 ctggatggag aatccatggg tgaagggtgga taccattgca gccgacgaga 450
 gcttctccca ggtggacctg ggtggccgcg tcatgaaaat caacaccgag 500
 gtgoggagct tcggacctgt gtcccgcagc ggcttctacc tggccttcca 550
 ggactatggc ggctgcatgt ccctcatcgc cgtgcgtgtc ttctaccgca 600
 agtgcccccg catcatccag aatggcgcca tottccagga aacctgtcg 650
 ggggctgaga gcacatcgct ggtggctgcc cggggcagct gcatcgccaa 700
 tgcggaagag gtggatgtac ccatcaagct ctactgtaac ggggacggcg 750
 agtggctggt gcccatcggg cgctgcatgt gcaaagcagg cttcgaggcc 800
 gttgagaatg gcaccgtctg ccgaggttgt ccatctggga ctttcaaggc 850
 caaccaaggg gatgaggcct gtacccactg tccatcaac agccggacca 900
 cttctgaagg ggccaccaac tgtgtctgcc gcaatggcta ctacagagca 950
 gacctggacc ccctggacat gccctgcaca accatcccct ccgcgcccc 1000
 ggctgtgatt tccagtgtca atgagacctc cctcatgctg gagtggacc 1050
 ctccccgca ctccggaggc cgagaggacc tcgtctaaa catcatctgc 1100
 aagagctgtg gctcgggccg ggggtgcctgc acccgctgcg gggacaatgt 1150
 acagtacgca ccacgccagc taggcctgac cgagccacgc atttacatca 1200
 gtgacctgct ggcccacacc cagtacacct tcgagatcca ggctgtgaac 1250
 ggcgttactg accagagccc cttctcgct cagttcgct ctgtgaacat 1300
 caccaccaac caggcagctc catcggcagt gtccatcatg catcaggtga 1350
 gccgcaccgt ggacagcatt accctgtcgt ggtcccagcc ggaccagccc 1400

ES 2 398 568 T3

aatggcgtga tcctggacta tgagctgcag tactatgaga aggagctcag 1450
tgagtacaac gccacagcca taaaagccc caccaacacg gtcaccgtgc 1500
agggcctcaa agccggcgcc atctatgtct tccaggtgcg ggcacgcacc 1550
gtggcaggct acgggcgcta cagcggcaag atgtacttcc agaccatgac 1600
agaagccgag taccagacaa gcatccagga gaagttgcca ctcatcatcg 1650
gctcctcggc cgctggcctg gtcttctca ttgctgtggt tgtcatcgcc 1700
atcgtgtgta acagacgggg gtttgagcgt gctgactcgg agtacacgga 1750
caagctgcaa cactacacca gtggccacat gaccccaggc atgaagatct 1800
acatcgatcc tttcacctac gaggaccca acgaggcagt gcgggagttt 1850
gccaaggaaa ttgacatctc ctgtgtcaaa attgagcagg tgatcggagc 1900
aggggagttt ggcgaggtct gcagtggcca cctgaagctg ccaggcaaga 1950
gagagatctt tgtggccatc aagacgctca agtcgggcta cacggagaag 2000
cagcgccggg acttctctgag cgaagcctcc atcatgggccc agttcgacca 2050
tcccaacgtc atccacctgg aggggtgtcgt gaccaagagc acacctgtga 2100
tgatcatcac cgagttcatg gagaatggct ccctggactc ctttctccgg 2150
caaaacgatg ggcagttcac agtcatccag ctggtgggca tgcttcgggg 2200
catcgagct ggcatgaagt acctggcaga catgaactat gttcacctgtg 2250
acctggctgc ccgcaacatc ctctcaaca gcaacctggt ctgcaaggtg 2300
tcggactttg ggctctcacg ctttctagag gacgatacct cagacccac 2350
ctacaccagt gccctgggcg gaaagatccc catccgctgg acagccccgg 2400
aagccatcca gtaccggaag ttcacctcgg ccagtgatgt gtggagctac 2450
ggcattgtca tgtgggaggt gatgtcctat ggggagcggc cctactggga 2500
catgaccaac caggatgtaa tcaatgccat tgagcaggac tatcggctgc 2550
caccgccc at ggactgcccg agcgcctgc accaactcat gctggactgt 2600
tggcagaagg accgcaacca ccggccaag ttcggccaaa ttgtcaacac 2650
gctagacaag atgatccgca atcccaacag cctcaaagcc atggcgcccc 2700
tctcctctgg catcaacctg ccgctgctgg accgcacgat ccccgactac 2750
accagcttta acacggtgga cgagtggctg gaggccatca agatggggca 2800
gtacaaggag agcttcgcca atgccggctt cacctccttt gacgtcgtgt 2850
ctcagatgat gatggaggac attctccggg ttggggtcac tttgctggc 2900

ES 2 398 568 T3

caccagaaaa aaatcctgaa cagtatccag gtgatgcggg cgcagatgaa 2950
ccagattcag tctgtggagg ttgacattc acctgcctcg gtcacacct 3000
tctccaagc cccgccccct ctgccccacg tgccggccct cctggtgctc 3050
tatccactgc agggccagcc actcgccagg aggccacggg ccacgggaag 3100
aaccaagcgg tgccagccac gagacgtcac caagaaaaca tgcaactcaa 3150
acgacggaaa aaaaaaggga atgggaaaaa agaaaacaga tcctgggagg 3200
gggcgggaaa tacaaggaat attttttaaa gaggattctc ataaggaaag 3250
caatgactgt tcttgccggg gataaaaaag ggcttgggag attcatgcca 3300
tgtgtccaat cggagacaaa agcagtttct ctccaactcc ctctgggaag 3350
gtgacctggc cagagccaag aaacactttc agaaaaaca atgtgaaggg 3400
gagagacagg ggccgccctt ggctcctgtc cctgctgctc ctctaggcct 3450
cactcaaca ccaagcgcct ggaggacggg acagatggac agacagccac 3500
cctgagaacc cctctgggaa aatctattcc tgccaccact gggcaaacag 3550
aagaattttt ctgtcttttg agagtatttt agaaactcca atgaaagaca 3600
ctgtttctcc tgttggctca cagggctgaa aggggctttt gtcctcctgg 3650
gtcagggaga acgcggggac cccagaaagg tcagccttcc tgaggatggg 3700
caacccccag gtctgcagct ccaggtacat atcacgcgca cagcctggca 3750
gcctggccct cctggtgcc actcccgcca gccctgcct cgaggctgac 3800

<210> 15

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

10 gccctcctgg tgcttatcc 20

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 16

tctgtccatc tgtcccgctc t 21

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el pronóstico de cáncer en un sujeto humano diagnosticado con cáncer colorrectal, comprendiendo el procedimiento: (a) comparar la expresión de EphB2 en una muestra de tejido o célula colorrectal del paciente con la expresión de EphB2 en una muestra de control; y (b) predecir el pronóstico de cáncer del paciente basándose en la comparación en (a), en el que el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a una muestra de control es pronóstica de duración elevada de la supervivencia o duración elevada de la supervivencia sin reaparición en el sujeto.
- 10 2. Un procedimiento para la selección del tratamiento para cáncer colorrectal para un paciente humano, comprendiendo el procedimiento (a) comparar la expresión de EphB2 en una muestra de tejido o célula colorrectal del paciente con la expresión de EphB2 en una muestra de control; (b) predecir el pronóstico de cáncer del paciente basándose en la comparación en (a), en el que el aumento de la expresión de EphB2 en la muestra de paciente con respecto a la muestra de control es pronóstica de duración elevada de la supervivencia o duración elevada de la supervivencia sin reaparición en el sujeto; y (c) posterior a las etapas (a) y (b), seleccionar el tratamiento contra el cáncer para el paciente, en el que la selección del tratamiento se basa en el pronóstico del paciente determinado en la etapa (b).
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se detecta la expresión del polinucleótido EphB2.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que se detecta la expresión del polipéptido EphB2.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que se detecta la expresión de ARNm de EphB2.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la expresión del polipéptido EphB2 se detecta usando un agente anti-EphB2.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el agente anti-EphB2 es un anticuerpo.
8. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la expresión del polipéptido EphB2 se detecta usando inmunohistoquímica.
- 35 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además detección de expresión de uno cualquiera o más ligandos de EphB2.
10. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-EphB2.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el inmunoconjugado comprende un maitansinoide.
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el inmunoconjugado comprende MMAE.
- 45 13. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el tratamiento comprende una cualquiera o más de quimioterapia, radiación y cirugía.
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que se detecta la expresión del polinucleótido EphB2.
- 50 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que se detecta la expresión del polipéptido EphB2.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que se detecta la expresión de ARNm de EphB2.
- 55 17. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la expresión del polipéptido EphB2 se detecta usando un agente anti-EphB2.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el agente anti-EphB2 es un anticuerpo.
- 60 19. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la expresión del polipéptido EphB2 se detecta usando inmunohistoquímica.
20. Los procedimientos de cualquiera de las reivindicaciones 10-19, que comprenden además detección de la expresión de uno cualquiera o más ligandos de EphB2.
- 65

21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10-20, en el que el anticuerpo anti-EphB2 presente en el inmunoconjugado está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo.

5

FIGURA 1

MALRRLGAALLLLPLLAAVEETLMDSTTATAELGWMVHPPSGWE
 EVSGYDENMNTIRTYQVCNVFESSQNNWLRTKFIRRRGAHRIHVEMKFSVRDCSSIPS
 VPGSCKETFNLYYYEADFDSATKTFPNWMENPWVKVDTIAADESFSQVDLGGRVMKIN
 TEVRSFGPVSRSGFYLAFAQDYGGCMSLIAVRVFYRKCPRIIQNGAIFQETLSGAESTS
 LVAARGSCIANAEVDVPIKLYCNGDGEWLVPIGRCMCKAGFEAVENGTVCRGCPSGT
 FKANQGDEACTHCPINSRTTSEGATNCVCRNGYYRADLDPLDMPCTTIPSAQAVISS
 VNETSLMLEWTPPRDSGGREDLVYNIICKSCGSGRGACTRCGDNVQYAPRQLGLTEPR
 IYISDLLAHTQYTFEIQAVNGVTDQSPFSPQFASVNIITNQAAPSAVSIMHQVSRTVD
 SITLSWSQPDQPNGVILDYELQYYEKELSEYNATAIKSPTNTVTVQGLKAGAIYVFQV
 RARTVAGYGRYSGKMYFQTMTEAEYQTSIQEKLPLIIGSSAAGLVFLIAVVVIAIVCN
 RRGFERADSEYTDKLOHYTSGHMTPGMKIYIDPFTYEDPNEAVREFAKEIDISCVKIE
 QVIGAGEFGEVCSGHLKLPKREIFVAIKTLKSGYTEKQRRDFLSEASIMGQFDHPNV
 IHLEGVVTKSTPVMIIITEFMENGLSDSFLRQNDGQFTVIQLVGMLRGLAAGMKYLADM
 NYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEDDTSDPTYTSALGGKIPIRWTAPEAI
 QYRKFTSASDVWSYGIWMWEVMSYGERPYWDMTNQDVINAIEQDYRLPPMDCPSALH
 QLMLDCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKMIRNPNSLKAMAPLSSGINLPLLDRTIPDYTS
 FNTVDEWLEAIKMGQYKESFANAGFTSFDVVSQMMEDI LRVGVTLAGHQKKILNSIQ
 VMRAQMNQIQSVEGQPLARRPRATGRTRKRCQPRDVTKKT CNSNDGKKKGMGKKKTDPG
 RGREIQGIFFKEDSHKESNDCSCGG

FIGURA 2A

```

1  gccccgggaa  gcgcagccat  ggctctgcgg  aggctggggg  ccgcgctgct  gctgetgccg
61  ctgctcgccg  ccgtggaaga  aacgctaata  gactccacta  cagcgactgc  tgagctgggc
121  tggatggtgc  atcctccatc  aggggtggaa  gaggtgagtg  gctacgatga  gaacatgaac
181  acgatccgca  cgtaccaggt  gtgcaacgtg  tttgagtcaa  gccagaacaa  ctggctacgg
241  accaagttta  tccggcgccg  tggcgcccac  cgcattccac  tggagatgaa  gttttcgggtg
301  cgtgactgca  gcagcatccc  cagcgtgcct  ggctcctgca  aggagacctt  caacctctat
361  tactatgagg  ctgactttga  ctccggccacc  aagaccttcc  ccaactggat  ggagaatcca
421  tgggtgaagg  tggataccat  tgcagccgac  gagagcttct  cccagggtgga  cctgggtggc
481  gccgtcatga  aaatcaacac  cgaggtgcgg  agcttcggac  ctgtgtcccg  cagcggcttc
541  tacctggcct  tccaggacta  tggcggctgc  atgtccctca  tcgccgtgcg  tgtcttctac
601  cgcaagtgcc  cccgcatcat  ccagaatggc  gccatcttcc  aggaaacctt  gtcgggggct
661  gagagcacat  cgtggtggc  tgcccggggc  agctgcatcg  ccaatgcgga  agaggtggat
721  gtacccatca  agctctactg  taacggggac  ggcgagtgcc  tggtgcccat  cgggcgctgc
781  atgtgcaaag  caggcttcga  ggcggttgag  aatggcaccg  tctgcccagg  ttgtccatct
841  gggactttca  aggccaaacca  aggggatgag  gcctgtacce  actgtcccat  caacagccgg
901  accacttctg  aaggggccac  caactgtgtc  tgcgcgaatg  gctactacag  agcagacctg
961  gacccctgg  acatgccctg  cacaccatc  cectccgcgc  cccaggctgt  gatttccagt
1021  gtcaatgaga  cctccctcat  gctggagtg  accctcccc  gcgactccgg  aggccgagag
1081  gacctcgtct  acaacatcat  ctgcaagagc  tgtggctcgg  gccggggtgc  ctgcaaccgc
1141  tgcggggaca  atgtacagta  cgcaccacgc  cagctaggcc  tgaccgagcc  acgcatttac
1201  atcagtgacc  tgctggccca  caccagtac  accttcgaga  tccaggctgt  gaacggcggt
1261  actgaccaga  gcccttctc  gctcagttc  gcctctgtga  acatcaccac  caaccaggca
1321  gctccatcgg  cagtgtccat  catgcatcag  gtgagccgca  ccgtggacag  cattaccctg
1381  tcgtggtccc  agcoggacca  gccaatggc  gtgatcctgg  actatgacct  cgagtaactat
1441  gagaaggagc  tcagtgagta  caacgccaca  gccataaaaa  gccccacca  gccggtcac
1501  gtgcagggcc  tcaaagccgg  cgcctctat  gtctccagg  tgcgggcacg  caccgtggca
1561  ggctacgggc  gctacagcgg  caagatgtac  ttccagacca  tgacagaagc  cgagtaccag
1621  acaagcatcc  aggagaagtt  gccactcatc  atcggtcct  cggccgctgg  cctggtcttc
1681  ctcatgtctg  tggttgtcat  cgcatcgtg  tghtaacagac  gggggtttga  gcgtgctgac
1741  tcggagtaca  cggacaagct  gcaacactac  accagtgcc  acatgacccc  aggcattgag
1801  atctacatcg  atcctttcac  ctacgaggac  cccaacgagg  cagtgcggga  gtttgccaag
1861  gaaattgaca  tctcctgtgt  caaaattgag  caggtgatcg  gagcagggga  gtttggcgag
1921  gtctgcagtg  gccactgaa  gctgccaggc  aagagagaga  tctttgtggc  ctcaagacg
1981  ctcaagtcgg  gctacagcga  gaagcagcgc  cgggacttcc  tgagcgaagc  ctccatcatg
2041  ggccagttcg  accatccca  cgtcatccac  ctggagggtg  tcgtgacca  gagcacacct
2101  gtgatgatca  tcaccgagtt  catggagaat  ggctccctgg  actcctttct  ccggcaaac
2161  gatgggcagt  tcacagtcac  ccagctgggt  ggcatgcttc  ggggatcgc  agctggcatg
2221  aagtacctgg  cagacatgaa  ctatgttcac  cgtgacctgg  ctgcccgcaa  catcctcgtc
2281  aacagcaacc  tggctctgaa  ggtgtcggac  tttgggctct  cacgctttct  agaggacgat
2341  acctcagacc  ccacctacac  cagtgcctg  ggcggaaaga  tccccatccg  ctggacagcc
2401  ccggaagcca  tccagtaccg  gaagttcacc  tcggccagtg  atgtgtggag  ctacggcatt
2461  gtcagtggg  aggtgatgtc  ctatggggag  cggccctact  gggacatgac  caaccaggat
2521  gtaatcaatg  ccattgagca  ggactatcgg  ctgccaccgc  ccatggactg  cccgagcgc
2581  ctgcaccaac  tcatgctgga  ctgttggcag  aaggaccgca  accaccggcc  caagttcggc
2641  caaattgtca  acacgctaga  caagatgatc  cgcaatcca  acagcctcaa  agccatggcg
2701  cccctctcct  ctggcatcaa  cctgcccgtg  ctggaccgca  cgatcccga  ctacaccagc
2761  tttaacacgg  tggacgagtg  gctggaggcc  atcaagatgg  ggcagtaca  ggagagcttc
2821  gccaatgccc  gcttcacctc  ctttgacgtc  gtgtctcaga  tgatgatgga  ggacattctc
2881  cgggttggg  tcaacttggc  tggccaccag  aaaaaatcc  tgaacagtat  ccaggtgatg
2941  cgggcgcaga  tgaaccagat  tcagtctgtg  gagggccagc  cactcgccag  gaggccacgg
3001  gccacgggaa  gaaccaagcg  gtgccagcca  cgagacgtca  ccaagaaaac  atgcaactca
3061  aacgacggaa  aaaaaaggg  aatgggaaaa  aagaaaacag  atcctgggag  ggggggggaa
3121  atacaaggaa  tatttttta  agaggattct  cataaggaaa  gcaatgactg  ttcttgccgg

```

FIGURA 2B

```

3181 ggataaaaaa gggcttggga gattcatgcg atgtgtccaa tcggagacaa aagcagtttc
3241 tctccaactc cctctgggaa ggtgacctgg ccagagccaa gaaacacttt cagaaaaaca
3301 aatgtgaagg ggagagacag gggccgcctt tggctcctgt ccttgctgct cctctaggcc
3361 tcaactcaaca accaagcgcc tggaggacgg gacagatgga cagacagcca ccctgagaac
3421 ccctctggga aaatctattc ctgccaccac tgggcaaaca gaagaatfff tctgtctttg
3481 gagagtatff tagaaactcc aatgaaagac actgtttctc ctgttggctc acagggctga
3541 aaggggctff tgtcctcctg ggtcagggag aacgcgggga ccccagaaag gtcagccttc
3601 ctgaggatgg gcaaccccca ggtctgcagc tccaggtaca tatcacgcgc acagcctggc
3661 agcctggccc tcctggtgcc cactcccgcc agcccctgcc togaggactg atactgcagt
3721 gactgccgct agctccgact gccgctgaga agggttgatc ctgcatctgg gtttgtttac
3781 agcaattcct ggactcgggg gtatffttggt cacaggggtg tffttggtta gggggtttgt
3841 ttggtggggt gttttttggt ttttggtfff ttttaatgac aatgaagtga cactttgaca
3901 tttcctacct ttgaggact tgatccttct ccaggaagaa ggtgctttct gcttactgac
3961 ttaggcaata caccaagggc gagatfftat atgcacattt ctggatfftt ttatacggtt
4021 ttcattgaca ctcttccctc ctcccacctg ccaccaggcc tcaccaaaagc ccaactgccat
4081 ggggccatct gggccattca gagactggag tgagatfftg gtgtggaggg ggagggccca
4141 aggtggagga gcttcccact ccaggactgt tgatgaaagg gacagattga ggaggaagtg
4201 ggctctgagg ctgcagggct ggaagtcctt gcccacttcc cactctcctg ccccaatcta
4261 tctagtactt cccaggcaaa taggcccctt tgaggctcct gagtgccttc agatggtcaa
4321 aaccagttt tccctctggg agcctaaacc aggctgcac cggaggccagg acccggatca
4381 ttcactgtga taccctgccc tccagagggg gcgctcagag acacgggcaa gcatgcctct
4441 tcccttccct ggagagaaag tgtgtgattt ctctcccacc tcttccccc caccagacct
4501 ttgctgggcc taaaggtctt ggccatgggg acgcccctcag tctagggatc tggccacaga
4561 ctccctcctg tgaaccaaca cagacaccca agcagagcaa tcagttagtg aattgaatgg
4621 aaataaacgc tttagttata a

```

```

péptido señal      19..72
péptido maduro    73..3183
sitio de poli A 3905
sitio de poli A 3989
señal de poli A 4622..4627
sitio de poli A 4641

```

FIGURA 3

MALRRLGAALLLLPLLAAVEETLMDSTTATAELGMMVHPPSGWE
 EVSGYDENMNTIRTYQVCNVFESSQNNWLRTKFIRRRGAHR IHVEMKFSVRDCSSIPS
 VPGSCKETFNLYYYEADFDSATKTFPNWMENPWVKVDTIAADESFSQVDLGGRVMKIN
 TEVRSFGPVSRSGFYLAFOQDYGGCMSLIAVRVIFYRKCPRI IQNGAIFQETLSGAESTS
 LVAARGSCIANAEVDVPIKLYCNGDGEWLVPIGRCMCKAGFEAVENGTVCRCGCPST
 FKANQGDEACTHCPINSRTTSEGATNCVCRNGYYRADLDPLDMPCTTIPSAQAVISS
 VNETSLMLEWTPPRDSGGREDLVYNIICKSCGSGRGACTRCGDNVQYAPRQLGLTEPR
 IYISDLLAHTQYTFEIQAVNGVTDQSPFSPQFASVNIITNQAAPSAVSIMHQVSRRTVD
 SITLSWSQPDQPNGVILDYELQYYEKELSEYNATAIKSPTNTVTVQGLKAGAIYVFQV
 RARTVAGYGRYSGKMYFQTMTEAEYQTSIQEKLPLIIGSSAAGLVFLIAVVVIAIVCN
 RRRGFERADSEYTDKLOHYTSGHMTPGMKIYIDPFTYEDPNEAVREFAKEIDISCVKI
 EQVIGAGEFGEVCSGHLKLPKREIFVAIKTLKSGYTEKQRRDFLSEASIMGQFDHPN
 VIHLEGVVTKSTPVMIIITEFMENGLDSFLRQNDGQFTVIQLVGMLRGIAAGMKYLAD
 MNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEDDTSDPTYTSALGGKIPIRWTAPEA
 IQYRKFTSASDVWSYGIVMWEVMSYGERPYWDMTNQDVINAIEQDYRLPPPMDCPSAL
 HQLMLDCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKMI RNPNSLKAMAPLSSGINLPLLDRTIPDYT
 SFNTVDEWLEAIKMGQYKESFANAGFTSFDVVSQMMEDILRVGVTLAGHQKKILNSI
 QVMRAQMNQIQSVEV

FIGURA 4A

```

1  gccccgggaa ggcgagccat ggctctgceg aggetggggg ccgcgctgct gctgctgccg
61  ctgctcgccg ccgtggaaga aacgctaata gactccacta cagcgactgc tgagctgggc
121  tggatggtgc atcctccatc aggggtggaa gaggtgagtg gctacgatga gaacatgaac
181  acgatccgca cgtaccaggt gtgcaacgtg tttgagtcaa gccagaacaa ctggctacgg
241  accaagttta tccggcgccg tggcgcccac cgcacccacg tggagatgaa gttttcggtg
301  cgtgactgca gcagcatccc cagcgtgcct ggctcctgca aggagacctt caacctctat
361  tactatgagg ctgactttga ctcgccacc aagaccttc ccaactggat ggagaatcca
421  tgggtgaagg tggataccat tgcagccgac gagagcttct cccaggtgga cctgggtggc
481  cgcgtcatga aatcaacac cgaggtgceg agcttcggac ctgtgtcccg cagcgcttc
541  tacctggcct tccaggacta tggcggtgc atgtccctca tcgccgtgcg tgtctctac
601  cgcaagtgcc cccgcatcat ccagaatggc gccatcttcc aggaaacctt gtcgggggct
661  gagagcacat cgctggtggc tgcccggggc agctgcatcg ccaatgcgga agaggtggat
721  gtacccatca agctctactg taacggggac ggcgagtggc tggtgcccat cggcgctgc
781  atgtgcaaag caggtctcga ggccgttgag aatggcaccg tctgcccagg ttgtccatct
841  gggactttca aggccaaacca aggggatgag gcctgtacc actgtcccat caacagccgg
901  accactttctg aaggggccac caactgtgtc tgccgcaatg gctactacag agcagacctg
961  gaccccttg acatgcccctg cacaaccate cctccgccc cccaggtgtt gatttccagt
1021  gtcaatgaga cctccctcat gctggagtgg acccctcccc ggcagctcgg agcccgagag
1081  gacctcgtct acaacatcat ctgcaagagc tgtggctcgg gccggggtgc ctgcccgcg
1141  tgcggggaca atgtacagta cgcaccacgc cagctaggcc tgaccgagcc acgcatttac
1201  atcagtgacc tgctggccca caccagtac accttcgaga tccaggctgt gaacggcgct
1261  actgaccaga gcccttctc gectcagttc gctctgtga acatcaccac caaccaggca
1321  gctccatcgg cagtgtccat catgcatcag gtgagccgca ccgtggacag cattaccctg
1381  tctggtccc agccggacca gcccaatggc gtgatcctgg actatgagct gcagtactat
1441  gagaaggagc tcagtgagta caacgccaca gccataaaaa gccccacca cacggtcacc
1501  gtgcagggcc tcaaagccgg cgcctctat gtcttcaggg tgcgggcacg caccgtggca
1561  ggctacgggc gctacagcgg caagatgtac ttccagacca tgacagaagc cgagtaccag
1621  acaagcatcc aggagaagtt gccactcatc atcggtcct cggccgctgg cctggtcttc
1681  ctcatgtctg tggttgtcat cgccatcgtg tghtaacagaa gacgggggtt tgagcgtgct
1741  gactcggagt acacggacaa gctgcaacac tacaccagtg gccacatgac cccaggcatg
1801  aagatctaca tcgatccttt cacctacgag gaccccaacg aggcagtgeg ggagtttgcc
1861  aaggaaattg acatctcctg tgtcaaaatt gagcaggtga tccggagcagg ggagtttggc
1921  gaggctgca gtggccacct gaagctgcca ggcaagagag agatctttgt ggccatcaag
1981  acgtcaagt cgggtacac ggagaagcag cgcggggact tctgagcga agcctccatc
2041  atgggccagt tcgaccatcc caacgtcatc cacctggagg gtgtcgtgac caagagcaca
2101  cctgtgatga tcatcaccga gttcatggag aatggctccc tggactcctt tctccggcaa
2161  aacgatgggc agttcacagt catccagctg gtgggcatgc ttcggggcat cgcagctggc
2221  atgaagtacc tggcagacat gaactatgtt caccgtgacc tggctgcccg caacatcctc
2281  gtcaacagca acctggtctg caaggtgtcg gactttgggc tctcacgctt tctagaggac
2341  gatacctcag accccaccta caccagtgcc ctggggggaa agatccccat ccgctggaca
2401  gccccggaag ccatccagta cgggaagttc acctcgcca gtgatgtgtg gagctacggc
2461  attgtcatgt gggaggtgat gtctatggg gagcgccct actgggacat gaccaaccag
2521  gatgtaatca atgccattga gcaggactat cggctgccac cgcctatgga ctgcccgagc
2581  gccctgcacc aactcatgct ggactgttg cagaaggacc gcaaccaccg gcccaagttc
2641  ggccaaattg tcaacacgct agacaagatg atccgcaatc ccaacagcct caaagccatg
2701  gcgcccctct cctctggcat caacctgccc ctgctggacc gcacgatccc cgactacacc
2761  agctttaaca cggtggaaga gtggtggag gccatcaaga tggggcagta caaggagagc
2821  ttgcgcaatg ccggcttcac ctctttgac gtcgtgtctc agatgatgat ggaggacatt
2881  ctccgggttg gggtcacttt ggetggccac cagaaaaaaaa tctgaacag tatccaggtg
2941  atgcgggcgc agatgaacca gattcagctt gtggaggttt gacattcacc tgctcggct
3001  cactcttcc tccaagcccc gccctctctg cccacgtgc eggcctcct ggtgctctat
3061  cactgcagg gccagccact cgcaggagg ccacgggcca cgggaagaac caagcgggtg
3121  cagccacgag acgtcaccaa gaaaacatgc aactcaaacg acggaaaaaa aaagggatg
3181  ggaaaaaaga aaacagatcc tgggaggggg cgggaaatc aaggaatatt ttttaaagag
3241  gattctcata aggaaagcaa tgactgttct tgcgggggat aaaaaagggc ttgggagatt

```

FIGURA 4B

```

3301 catgcgatgt gtccaatcgg agacaaaagc agtttctctc caactccctc tgggaagggtg
3361 acctggccag agccaagaaa cactttcaga aaaacaaatg tgaaggggag agacaggggc
3421 cgcccttggc tctgtccct gctgctctc taggcctcac tcaacaacca agcgcttggg
3481 ggacgggaca gatggacaga cagccaccct gagaaccctt ctgggaaaat ctattcctgc
3541 caccactggg caaacagaag aatTTTTctg tctttggaga gtattttaga aactccaatg
3601 aaagacactg tttctcctgt tggctcacag ggctgaaagg ggcttttgtc ctectgggtc
3661 agggagaacg cggggacccc agaaaggcca gccttcctga ggatgggcaa cccccaggtc
3721 tgcagctcca ggtacatatc acgcgcacag cctggcagcc tggccctcct ggtgcccact
3781 cccgccagcc cctgcctega ggactgatac tgcagtgaact gccgtcagct ccgactgccg
3841 ctgagaaggg ttgatcctgc atctgggttt gtttacagca attcctggac tcgggggtat
3901 tttggtcaca ggggtgtttt ggtttagggg gtttgtttgt tgggttgttt tttgtttttt
3961 ggtttttttt aatgacaatg aagtgcactc ttgacatttc ctaccttttg aggacttgat
4021 ccttctccag gaagaagggt cttctgctt actgacttag gcaatacacc aagggcgaga
4081 ttttatatgc acatttctgg atttttttat acggttttca ttgacactct tcctcctcc
4141 cacctgccac caggcctcac caaagcccac tgccatgggg ccatctgggc cattcagaga
4201 ctggagtgag atttgggtgt ggagggggag gcgccaaggt ggaggagctt cccactccag
4261 gactgttgat gaaagggaca gattgaggag gaagtgggct ctgaggctgc agggctggaa
4321 gtccttgccc acttcccact ctectgccc aatctatcta gtacttcca ggcaaatagg
4381 ccccttttag gctcctgagt gccctcagat ggtcaaaacc cagttttccc tctgggagcc
4441 taaaccaggc tgcacggag gccaggacc ggatcattca ctgtgatacc ctgccctcca
4501 gaggggtgcg tcagagacac gggcaagcat gcctcttccc ttccctggag agaaagtgtg
4561 tgatttctct cccacctcct tccccccacc agaccttgc tgggctaaa ggtcttggcc
4621 atggggacgc cctcagtcta gggatctggc cacagactcc ctctgtgaa ccaacacaga
4681 cacccaagca gagcaatcag ttagtgaatt gaatggaat aaacgcttta gtataa

```

péptido señal 19..72

péptido maduro 73..2979

sitio de poli A4001

sitio de poli A4085

señal de poli A4718..4723

sitio de poli A4737

FIGURA 5

MALRRRLGAALLLLPLLAAVEETLMDSTTATAELGWMVHPPSGWEEVSGYDENMNTIRTYQVCNVFESSQNNWLR
 KPIRRGAHRIHVEMKFSVRDCSSIPSVPGSCKETFNLYYYEADFDSATKTFPNWMENPWVKVDITIAADESFSQV
 DLGGRVMKINTEVRSFGPVSRSGFYLAFOQYGGCMSLIAVRVVFYRKCPRIIQNGAIFQETLSGAESTSLVAARGS
 CIANAEEVDVPIKLYCNGDGEWLVPIGRCMCKAGFEAVENGTVCRCGCPSTGTFKANQGDEACTHCPINSRTTSEGA
 TNCVCRNGYYRADLDPLDMPCTTIPSAQAVISSVNETSLMLEWTPPRDSGGREDLVYNIICKSCGSGRGACTRC
 GDNVOYAPRQLGLTEPRIYISDLLAHTQYTFEIQAVNGVTDQSPFSPQFASVNIITNQAAPSAVSIHQVSRVTD
 SITLSWSQPDPNGVILDYELQYYEKELSEYNATAIKSPTNTVTVQGLKAGAIYVFQVRARTVAGYGRYSGKMYF
 QTMTEAEYQTSIQEKLPLIIGSSAAGLVFLIAVVVIAIVCNRRGFERADSEYTDKLOHYTSGHMTPGMKIYIDPF
 TYEDPNEAVREFAKEIDISCVKIEQVIGAGEFGEVCSGHLKLPKREIFVAIKTLKSGYTEKQRRDFLSEASIMG
 QFDHPNVIHLEGVVTKSTPVMIIIEFMENGLSFLRQNDGQFTVIQLVGMRLRGIAAGMKYLADMNYVHRDLAAR
 NILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEDDTSDPTYTSALGGKIPIRWTAPEAIQYRKFTSASDVWSYGIWMWEVMSYGER
 PYWDMTNQDVINAIEQDYRLPPPMDPCPSALHQLMLDQCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKMRNPNSLKAMAPLSSGI
 NLPLLDRTIPDYTSFNTVDEWLEAIKMGQYKESFANAGFTSFDVVSQMMMEDILRVGVTLAGHQKILNSIQVMR
 AQMNQIQSVEV

Secuencia señal.

aminoácidos 1-18

Dominio transmembrana.

aminoácidos 543-563

Sitios de N-glucosilación.

aminoácidos 265-268, 336-339, 428-431, 482-485, 704-707

Sitio de unión a glucosaminoglucano.

aminoácidos 367-370

Sitio de fosforilación de la proteína cinasa dependiente de cAMP y cGMP.

aminoácidos 801-804

Sitios de fosforilación de tirosina cinasa.

aminoácidos 374-381, 594-602, 735-742

Sitios de N-miristoilaciónaminoácidos 182-187, 213-218, 224-229, 271-276, 275-280, 299-304, 366-371,
497-502, 546-551, 705-710, 725-730, 729-734, 874-879, 957-962**Sitio de amidación.**

aminoácidos 643-646

Firma de sitio activo específico para las proteínas tirosina cinasas.

aminoácidos 742-754

Firma 1 de la clase V de tirosina cinasa receptora.

aminoácidos 182-198

Firma 2 de la clase V de tirosina cinasa receptora.

aminoácidos 241-264

Dominio de unión a ligando de receptor de efrina.

aminoácidos 20-197

Dominio de proteína cinasa.

aminoácidos 621-880

Dominios de tipo III de fibronectina.

aminoácidos 325-421, 436-520

Dominio SAM (motivo alfa estéril).

aminoácidos 911-975

Dominios de homología 2 con Src (SH2).

aminoácidos 733-769, 787-797, 806-819

FIGURA 6

CGGGAAGCGCAGCCATGGCTCTGCGGAGGCTGGGGGCCGCGCTGCTGCTGCTGCCGCTGCTCGCCGCCGTGGAAG
 AAACGCTAATGGACTCCACTACAGCGACTGCTGAGCTGGGCTGGATGGTGCATCCTCCATCAGGGTGGGAAGAGG
 TGAGTGGCTACGATGAGAACATGAACACGATCCGCACGTACCAGGTGTGCAACGTGTTTGTAGTCAAGCCAGAACA
 ACTGGCTACGGACCAAGTTTATCCGGCGCGTGGCGCCACCAGCATCCACGTGGAGATGAAGTTTTCGGTGCCTG
 ACTGCAGCAGCATCCCCAGCGTGCCTGGCTCCTGCAAGGAGACCTTCAACCTCTATTACTATGAGGCTGACTTTG
 ACTCGGCCACCAAGACCTTCCCCAACTGGATGGAGAAATCCATGGGTGAAGGTGGATACCAATTGCAGCCGACGAGA
 GCTTCTCCAGGTGGACCTGGGTGGCCGCGTCATGAAAATCAACACCGAGGTGCGGAGCTTCGGACCTGTGTCCC
 GCAGCGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACTATGGCGGCTGCATGTCCCTCATCGCCGTGCGTGTCTTCTACCGCA
 AGTGCCCCCGCATCATCCAGAATGGCGCATCTTCCAGGAAACCTGTGCGGGGCTGAGAGCACATCGCTGGTGG
 CTGCCCGGGCAGCTGCATCGCAATGCGGAAGAGGTGGATGTACCCATCAAGCTCTACTGTAACGGGGACGGCG
 AGTGGCTGGTGGCCATCGGGCGCTGCATGTGCAAGCAGGCTTCGAGGCCGTTGAGAAATGGCACCGTCTGCCGAG
 GTTGTCCATCTGGGACTTTCAAGGCCAACCAAGGGGATGAGGCCTGTACCCACTGTCCCATCAACAGCCGGACCA
 CTTCTGAAGGGGCCACCAACTGTGTCTGCCGAATGGCTACTACAGAGCAGACCTGGACCCCTGGACATGCCCT
 GCACAACCATCCCCCTCCGCGCCCAGGCTGTGATTTCCAGTGTCAATGAGACCTCCCTCATGCTGGAGTGGACCC
 TCCCCCGCATCCGAGGGCCGAGAGGACCTGCTCAACATCATCTGCAAGAGCTGTGGTTCGGGCCGGGGTG
 CCTGCACCCGCTGCGGGGACAATGTACAGTACGCACCCAGCCAGCTAGGCCTGACCGAGCCACGCATTTACATCA
 GTGACCTGTGGCCACACCCAGTACACCTTCGAGATCCAGGCTGTGAACGGCGTTACTGACCAGAGCCCCTTCT
 CGCCTCAGTTCGCCTCTGTGAACATCACCCCAACCAGGCAGCTCCATCGGCAGTGTCCATCATGCATCAGGTGA
 GCCGCACCGTGGACAGCATTACCCTGTGCTGGTCCAGCCGGACCAGCCCAATGGCGTGTATCCTGGACTATGAGC
 TGCAGTACTATGAGAAGGAGCTCAGTGTGATCAACGCCACAGCCATAAAAAGCCCCACCAACACGGTACCCGTG
 AGGGCCTCAAAGCCGGCGCCATCTATGTCTTCCAGGTGCGGGCACGCACCGTGGCAGGCTACGGGCGCTACAGCG
 GCAAGATGTACTTCCAGACCATGACAGACCGGATGACAGCAAGCATCCAGGAGAGTTCAGCCATCATCATCG
 GCTCTCGGCCGCTGGCCTGGTCTTCTCATGCTGTGGTGTGTCATCGCCATCGTGTGTAACAGACGGGGTTTG
 AGCGTGTGACTCGGAGTACACGGACAAGCTGCAACACTACACAGTGGCCACATGACCCAGGCATGAAGATCT
 ACATCGATCCTTTACCTACGAGGACCCCAACGAGGCAGTGCAGGAGTTTGCCAAGGAAATTTGACATCTCCTGTG
 TCAAAATTGAGCAGGTGATCGGAGCAGGGGAGTTTGGCGAGGTCTGCAGTGGCCACCTGAAGCTGCCAGGCAAGA
 GAGAGATCTTTGTGGCCATCAAGACGCTCAAGTCGGGCTACACGGAGAAGCAGCGCCGGGACTTCTGAGCGAAG
 CCTCCATCATGGGCCAGTTTCGACCATCCCAACGTCAACCCCTGGAGGGTGTGCTGACCAAGAGCACACCTGTGA
 TGATCATCCGAAATTCATGAGAAATGGCTCCCTGGACTCCTTTCTCCGGCAAACGATGGGCAGTTCACAGTCA
 TCCAGCTGGTGGGCATGCTTCGGGGCATCGCAGCTGGCATGAAGTACCTGGCAGACATGAACTATGTTACCGTG
 ACCTGGCTGCCCGCAACATCCTCGTCAACAGCAACCTGGTCTGCAAGGTGTGCGACTTTGGGCTCTCACGCTTTC
 TAGAGGACGATACCTCAGACCCACCTACACAGTGCCTGGGCGGAAAGATCCCCATCCGCTGGACAGCCCCGG
 AAGCCATCCAGTACCGGAAGTTCACTCGGCCAGTGTATGTGAGGACTACGGCATTGTATGTGGGAGGTGATGT
 CCTATGGGGAGCGGCCCTACTGGGACATGACCAACCAGGATGTAATCAATGCCATTGAGCAGGACTATCGGCTGC
 CACCGCCCATGGACTGCCCGAGCGCCCTGCACCAACTCATGCTGGACTGTTGGCAGAAGGACCGCAACCACCGGC
 CCAAGTTCGGCCAAATTTGTCAACAGCTAGACAAGATGATCCGCAATCCCAACAGCCTCAAAGCCATGGCGCCCC
 TCTCTCTGGCATCAACCTGCCGCTGCTGGACCGCACGATCCCCGACTACACCAGCTTTAAACACGGTGGACGAGT
 GGCTGGAGGCCATCAAGATGGGGCAGTACAAGGAGAGCTTCGCCAATGCCGGCTTCACCTCCTTTGACGTGCTGT
 CTCAGATGATGATGGAGGACATTTCCGGGTTGGGGTCACTTTGGCTGGCCACCAGAAAAAATCCTGAACAGTA
 TCCAGGTGATGCGGGCGCAGATGAACCAGATTAGTCTGTGGAGGTTTGACATTCACCTGCCTCGGCTCACCTCT
 TCCTCAAAGCCCCGCCCTCTGCCCCAGTGCAGGCCCCCTCTGGTGTCTATCCACTGCAGGGCCAGCCACTCG
 CCAGGAGGCCACGGCCACGGGAAGAACAAGCGGTGCCAGCCACGAGACGTCACCAAGAAAAATGCAACTCAA
 ACGACGAAAAAAGGGAAATGGGAAAAAAGAAAACAGATCCTGGGAGGGGGCGGGAAATAACAAGGAATATTTT
 TAAAGAGGATTCTCATAAGGAAAGCAATGACTGTTCTTGGCGGGGATAAAAAAGGCTTGGGAGATTATGCGA
 TGTGTCCAATCGGAGACAAAAGCAGTTTCTCTCAACTCCCTCTGGGAAGGTGACCTGGCCAGAGCCAAGAAACA
 CTTTCAGAAAAACAAATGTGAAGGGGAGAGACAGGGGCCCCCTTGGCTCCTGTCCCTGTGCTCCTCTAGGCCT
 CACTCAACAACCAAGCGCTGGAGGACGGGACAGATGGACAGACAGCCACCCTGAGAACCCCTCTGGGAAAATCT
 ATTCCTGCCACCCTGGGCAACAGAAATTTTCTGTCTTTGGAGAGTATTTTAGAAACTCCAATGAAAGACA
 CTGTTTCTCCTGTGGCTCACAGGGCTGAAAGGGCTTTGTCTCCTGCGGTGAGGAGAACCGGGGACCCAG
 AAAGGTGAGCCTTCTGAGGATGGGCAACCCCAAGTCTGCAGCTCAGGTACATATCACGGCACAGCCTGGCA
 GCCTGGCCCTCCTGGTGGCCACTCCCGCCAGCCCCCTGCCCTGAGGTCGAC

FIGURA 7

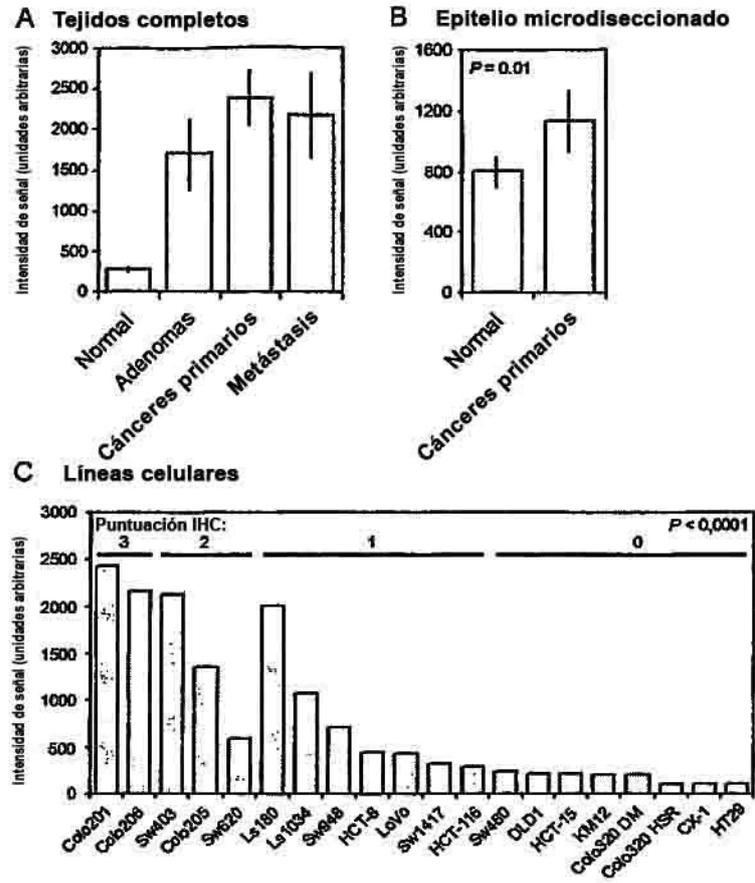


FIGURA 8

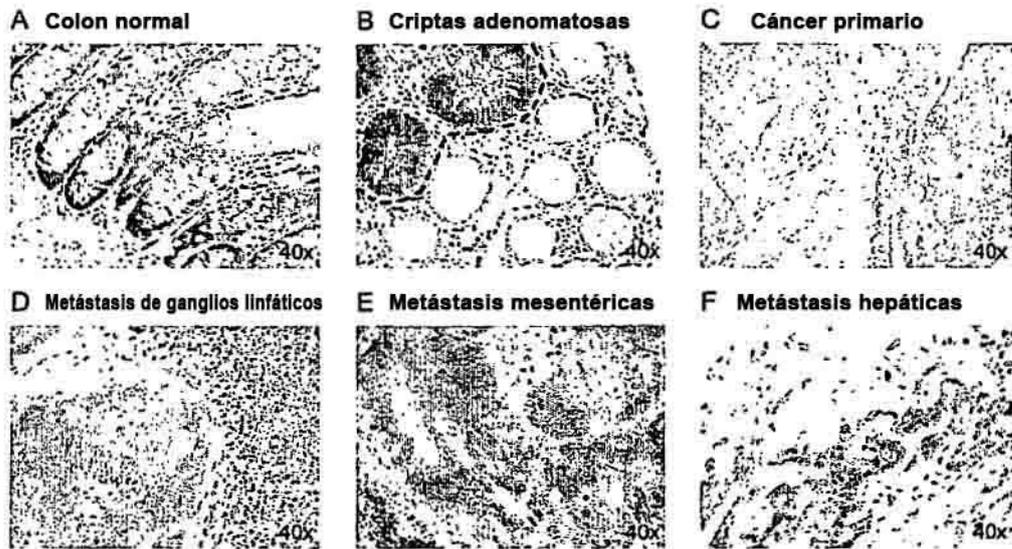


FIGURA 9

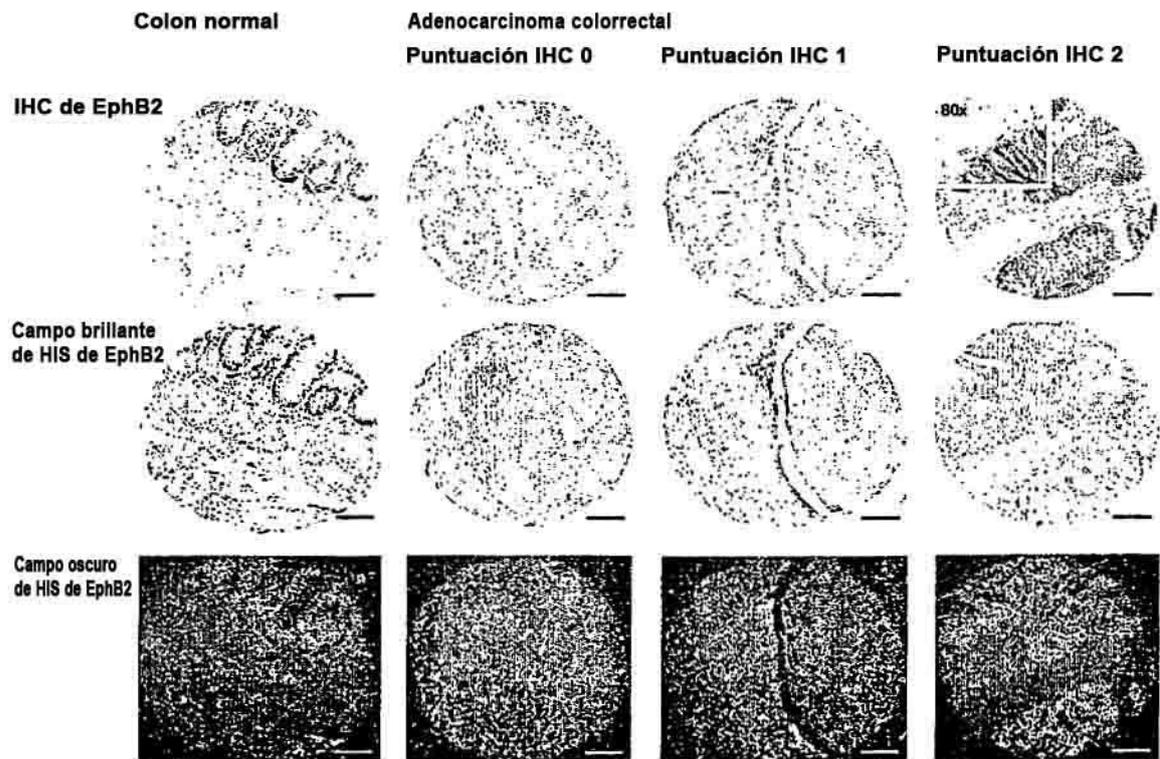


FIGURA 10

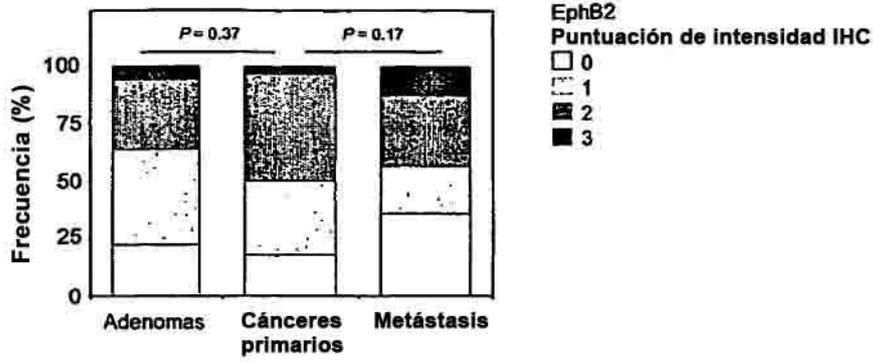
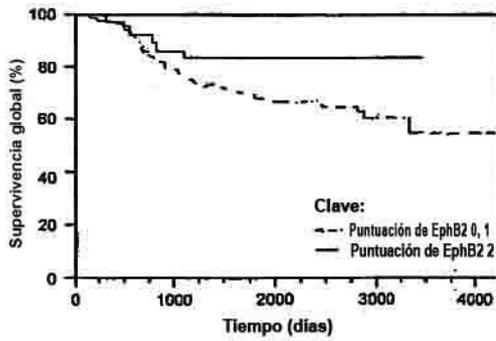


Figura 11

A Supervivencia global



B Supervivencia sin reaparición

