

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 814**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2008 E 11184356 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2412828**

54 Título: **Mutaciones de K-ras y B-raf y terapia con anticuerpos anti-EGFr**

30 Prioridad:

13.03.2007 US 906976 P

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

25.10.2013

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
Law Department One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**SIENA, SALVATORE y
BARDELLI, ALBERTO**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 426 814 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutaciones de K-ras y B-raf y terapia con anticuerpos anti-EGFr

5 La presente solicitud se refiere a mutaciones de K-ras, a polinucleótidos que codifican para polipéptidos de K-ras mutantes y a métodos de identificación de mutaciones de K-ras. La presente solicitud también se refiere a mutaciones de B-raf, a polinucleótidos que codifican para polipéptidos de B-raf mutantes, a vectores que contienen esos polinucleótidos y a métodos de identificación de mutaciones de B-raf. La presente solicitud también se refiere a métodos de diagnóstico de cáncer; y a métodos y kits para predecir la utilidad de agentes de unión específica anti-EGFr en el tratamiento de tumores.

Antecedentes

15 Determinadas aplicaciones de anticuerpos monoclonales en terapia contra el cáncer se basan en la capacidad del anticuerpo para suministrar específicamente a los tejidos cancerosos funciones efectoras citotóxicas tales como fármacos, toxinas o isotipos que potencian la inmunidad. Un enfoque alternativo es utilizar anticuerpos monoclonales para afectar directamente a la supervivencia de células tumorales privándolas de señales de proliferación extracelulares esenciales, tales como las mediadas por factores de crecimiento a través de sus receptores celulares. Una de las dianas atractivas en este enfoque es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr), que se une a EGF y factor de crecimiento transformante α (TGF α) (véanse, por ejemplo, Ullrich *et al.*, Cell 61: 203-212, 1990; Baselga *et al.*, Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn *et al.*, en Biologic Therapy of Cancer 607-623, Filadelfia: J.B. Lippincott Co., 1995; Fan *et al.*, Curr. Opin. Oncol. 10: 67-73, 1998). La unión de EGF o TGF α a EGFr, una glicoproteína transmembrana de la superficie celular de 170 kDa, desencadena una cascada de acontecimientos bioquímicos celulares, incluyendo autofosforilación de EGFr e internalización, que culmina en proliferación celular (véase, por ejemplo, Ullrich *et al.*, Cell 61: 203-212, 1990).

20 Varias observaciones implican a EGFr en el soporte del desarrollo y la progresión de tumores sólidos humanos. Se ha demostrado que EGFr se sobreexpresa en muchos tipos de tumores sólidos humanos (véanse, por ejemplo, Mendelsohn Cancer Cells 7:359 (1989), Mendelsohn Cancer Biology 1: 339-344 (1990), Modjtahedi y Dean Int'l J. Oncology 4:277-296 (1994)). Por ejemplo, se ha observado sobreexpresión de EGF-r en determinados carcinomas de pulmón, de mama, de colon, gástrico, de cerebro, de vejiga, de cabeza y cuello, de ovario y de próstata (véase, por ejemplo, Modjtahedi y Dean Int'l J. Oncology 4: 277-296 (1994)). Se ha notificado que el aumento en los niveles de receptor está asociado con un mal pronóstico clínico (véanse, por ejemplo, Baselga *et al.* Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn *et al.*, biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Filadelfia: J.B. Lippincott Co., 1995; Modjtahedi *et al.*, Intl. J. of Oncology 4:277-296, 1994; Gullick, Br. Medical Bulletin, 47: 87-98, 1991; Salomon *et al.*, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 19: 183-232, 1995). Se ha demostrado que tanto el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α) se unen a EGF-r y conducen a proliferación celular y crecimiento tumoral. En muchos casos, el aumento de la expresión de EGFr en superficie estaba acompañado por la producción de TGF α o EGF por las células tumorales, lo que sugiere la implicación de un control del crecimiento autocrino en la progresión de esos tumores (véanse, por ejemplo, Baselga *et al.* Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn *et al.*, Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Filadelfia: J.B. Lippincott Co., 1995; Modjtahedi *et al.*, Intl. J. of Oncology 4:277-296, 1994; Salomon *et al.*, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 19: 183-232, 1995).

45 Por tanto, determinados grupos han propuesto que anticuerpos contra EGF, TGF- α y EGF-r pueden ser útiles en la terapia de tumores que expresan o sobreexpresan EGF-r (véanse, por ejemplo, Mendelsohn Cancer Cells 7:359 (1989), Mendelsohn Cancer Biology 1: 339-344 (1990), Modjtahedi y Dean Int'l J. Oncology 4: 277-296 (1994), Tosi *et al.* Int'l J. Cancer 62:643-650 (1995)). De hecho, se ha demostrado que anticuerpos anti-EGF-r que bloquean la unión de EGF y TGF- α al receptor parecen inhibir la proliferación de células tumorales. Sin embargo, al mismo tiempo, anticuerpos anti-EGF-r no parecen inhibir el crecimiento celular independiente de EGF y TGF- α (Modjtahedi y Dean Int'l J. Oncology 4:277-296 (1994)).

55 Se han generado anticuerpos monoclonales específicas frente al EGFr humano, que pueden neutralizar la unión de EGF y TGF α a células tumorales e inhibir la proliferación celular mediada por ligando *in vitro*, a partir de ratones y ratas (véanse, por ejemplo, Baselga *et al.*, Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn *et al.*, en Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Filadelfia: J.B. Lippincott Co., 1995; Fan *et al.*, Curr. Opin. Oncol. 10: 67-73, 1998; Modjtahedi *et al.*, Intl. J. Oncology 4: 277-296, 1994). Algunos de estos anticuerpos, tales como los anticuerpos monoclonales de ratón 108, 225 (véase, por ejemplo, Aboud-Pirak *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 80: 1605-1611, 1988) y 528 (véanse, por ejemplo, Baselga *et al.*, Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn *et al.*, en Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Filadelfia: J.B. Lippincott Co., 1995) o los de rata ICR16, ICR62 e ICR64 (véanse, por ejemplo, Modjtahedi *et al.*, Intl. J. Oncology 4: 277-296, 1994; Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 67: 247-253, 1993; Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 67: 254-261, 1993), se evaluaron extensamente por su capacidad para afectar al crecimiento tumoral en modelos de ratón de xenoinjerto. La mayoría de los anticuerpos monoclonales anti-EGFr eran eficaces en la prevención de la formación de tumores en ratones atómicos cuando se administraron junto con

las células tumorales humanas (Baselga *et al.* Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 67: 254-261, 1993). Cuando se inyectaron en ratones que llevaban xenoinjertos de tumores humanos establecidos, los anticuerpos monoclonales de ratón 225 y 528 provocaban una regresión tumoral parcial y requerían la administración conjunta de agente quimioterápicos, tales como doxorubicina o cisplatino, para la erradicación de los tumores (Baselga *et al.* Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn *et al.*, en Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Filadelfia: J.B. Lippincott Co., 1995; Fan *et al.*, Cancer Res. 53: 4637-4642, 1993; Baselga *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 85: 1327-1333, 1993). Una versión quimérica del anticuerpo monoclonal 225 (C225), en la que las regiones variables del anticuerpo de ratón están unidas a regiones constantes humanas, presentaba una actividad antitumoral *in vivo* mejorada pero sólo a altas dosis (véanse, por ejemplo, Goldstein *et al.*, Clinical Cancer Res. 1: 1311-1318, 1995; Prewett *et al.*, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19: 419-427, 1996). Los anticuerpos de rata ICR16, ICR62 e ICR64 provocaban regresión de tumores establecidos pero no su erradicación completa (Modjtahedi *et al.*, Br. J. Cancer 67: 254-261, 1993). Estos resultados establecieron a EGFr como una diana prometedoras para terapia con anticuerpos contra tumores sólidos que expresan EGFr y condujeron a ensayos clínicos en seres humanos con el anticuerpo monoclonal C225 en múltiples cánceres sólidos humanos (véanse, por ejemplo, Baselga *et al.* Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn *et al.*, Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Filadelfia: J.B. Lippincott Co., 1995; Modjtahedi *et al.*, Intl. J. of Oncology 4: 277-296, 1994).

Determinados avances en las técnicas biológicas hicieron posible producir un anticuerpo anti-EGFr completamente humano. Usando ratones transgénicos para genes de inmunoglobulinas humanas (tecnología Xenomouse™, Abgenix, Inc.), se desarrollaron anticuerpos humanos específicos para EGFr humano (véanse, por ejemplo, Mendez, Nature Genetics, 15: 146-156, 1997; Jakobovits, Adv. Drug Deliv. Rev., 31(1-2): 33-42, 1998; Jakobovits, Expert Opin. Invest. Drugs, 7(4): 607-614, 1998; Yang *et al.*, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 38(1): 17-23, 2001; documento W098/24893; documento WO 98/50433). Se ha mostrado que un anticuerpo de este tipo, panitumumab, un anticuerpo monoclonal de IgG2 humano con una afinidad de 5×10^{-11} M por EGFr humano, bloquea la unión de EGF al EGFr, bloqueando la señalización del receptor, e inhibiendo la activación y proliferación de células tumorales *in vitro* (véanse, por ejemplo, el documento W098/50433; la patente estadounidense n.º 6.235.883). Estudios en ratones atímicos han demostrado que panitumumab tiene también actividad *in vivo*, no sólo previniendo la formación de xenoinjertos A431 de carcinoma epidermoide humano en ratones atímicos, sino también erradicando xenoinjertos de tumor A431 grandes ya establecidos (véanse, por ejemplo, Yang *et al.*, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 38(1): 17-23, 2001; Yang *et al.*, Cancer Res. 59(6):1236-43, 1999). Se ha considerado panitumumab para el tratamiento de carcinoma renal, adenocarcinoma colorrectal, cáncer de próstata y carcinoma de pulmón escamoso de células no pequeñas, entre otros cánceres (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0033543), y están en marcha ensayos clínicos con ese anticuerpo. La Food & Drug Administration ha aprobado panitumumab para tratar pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

La activación de EGFr desencadena al menos dos rutas de señalización. En determinados tipos de células, la activación de EGFr previene la apoptosis mediante la estimulación de fosfatidilinositol 3-cinasa ("PI3K"). La activación de PI3K desencadena una cascada molecular que conduce a la regulación por disminución de las rutas centrales que controlan la muerte celular programada (Yao, R., Science 267:2003-2006, 1995). En determinados tipos de células, la activación de EGFr inicia la cascada de MAPK a través de Ras/Raf. Lièvre *et al.* Cancer Res 66:3992-5 (2006) dan a conocer que mutaciones en los codones 12 y 13 de K-RAS son factores de predicción de la resistencia de CRC al tratamiento con cetuximab.

Sumario

La invención proporciona métodos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

En determinadas realizaciones, se da a conocer un método de predicción de si paciente será insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, un método de este tipo comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en un tumor del paciente, en el que la mutación de K-ras es en el codón 12 o el codón 13. En determinadas realizaciones, si está presente una mutación de K-ras, se predice que el paciente es insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr.

En determinadas realizaciones, se da a conocer un método de predicción de si un tumor será insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, un método de este tipo comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en una muestra de dicho tumor, en el que la mutación de K-ras es en el codón 12 o el codón 13. En determinadas realizaciones, la presencia de la mutación de K-ras indica que el tumor será insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr.

En determinadas realizaciones, se da a conocer un método de predicción de si a paciente será insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, un método

de este tipo comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de B-raf en un tumor del paciente, en el que la mutación de B-raf es en el codón 600. En determinada realización, si está presente una mutación de B-raf, se predice que el paciente será insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr.

5 En determinadas realizaciones, se da a conocer un método de predicción de si un tumor será insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, un método de este tipo comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de B-raf en una muestra de dicho tumor, en el que la mutación de B-raf es en el codón 600. En determinadas realizaciones, la presencia de la mutación de B-raf indica que el tumor será insensible a un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr.

10 En determinadas realizaciones, se da a conocer un método de predicción de si a paciente será insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, un método de este tipo comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en un tumor del paciente, en el que la mutación de K-ras es en el codón 12 o el codón 13; y determinar la presencia o ausencia de una mutación de B-raf en un tumor del paciente, en el que la mutación de B-raf es en el codón 600. En determinadas realizaciones, si está presente al menos una de una mutación de K-ras y una mutación de B-raf, se predice que el paciente va a ser insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr.

15 En determinadas realizaciones, se da a conocer un método de predicción de si un tumor será insensible al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, un método de este tipo comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en una muestra de dicho tumor, en el que la mutación de K-ras es en el codón 12 o el codón 13; y determinar la presencia o ausencia de una mutación de B-raf, en el que la mutación de B-raf es en el codón 600. En determinadas realizaciones, la presencia de al menos una de la mutación de K-ras y la mutación de B-raf indica que el tumor será insensible al tratamiento con un agente de unión específica un polipéptido de EGFr.

Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 muestra la respuesta de pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCRC) tratado con el anticuerpo panitumumab. "Mut +" indica que un paciente presenta una mutación de K-ras o B-raf. "Mut -" indica que un paciente no presenta una mutación de K-ras o B-raf. EE significa enfermedad estable. EP significa enfermedad progresiva. RP significa respuesta parcial.

35 Las figuras 2A a 2H muestran las secuencias de aminoácidos y de ADNc para K-ras de tipo natural (SEQ ID NO: 1 y 2), K-ras mutante G12S (SEQ ID NO: 3 y 4), K-ras mutante G12V (SEQ ID NO: 5 y 6), K-ras mutante G12D (SEQ ID NO: 7 y 8), K-ras mutante G12A (SEQ ID NO: 9 y 10), K-ras mutante G12C (SEQ ID NO: 11 y 12), K-ras mutante G13A (SEQ ID NO: 13 y 14) y K-ras mutante G13D (SEQ ID NO: 15 y 16).

40 Las figuras 3A a 3D muestran las secuencias de aminoácidos y de ADNc para B-raf de tipo natural (SEQ ID NO: 17 y 18) y B-raf mutante V600E (SEQ ID NO: 19 y 20).

Descripción detallada de determinadas realizaciones

Definiciones

45 A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que se requiera lo contrario por el contexto, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

50 Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo o polinucleótidos descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se usan técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo tisular y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o como se lleva a cabo comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Los procedimientos y las técnicas precedentes se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y se comentan a lo largo de toda la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A laboratory Manual (28 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora en el presente documento como referencia. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas y los procedimientos de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y médica descritos en el presente documento

son los bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéuticas, y tratamiento de pacientes.

5 En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se establezca lo contrario. En el contexto de una reivindicación dependiente múltiple, el uso de "o" se refiere otra vez a más de una reivindicación dependiente o independiente precedente como alternativa sólo. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan ambos elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más una subunidad a menos que se establezca específicamente lo contrario.

10 Tal como se utilizan según la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse que tienen los siguientes significados:

15 Los términos "polinucleótido aislado" y "ácido nucleico aislado" se usan de manera intercambiable, y tal como se usan en el presente documento significarán un polinucleótido de origen genómico, de ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente unido a un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

20 Los términos "proteína aislada" y "polipéptido aislado" se usan de manera intercambiable, y tal como se les hace referencia en el presente documento significa una proteína de origen de ADNc, de ARN recombinante o sintético, o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo libre de proteínas murinas, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no se produce en la naturaleza.

25 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable y se usan en el presente documento como término genérico para referirse a proteína nativa, fragmentos, péptidos o análogos de una secuencia polipeptídica. Por tanto, proteína nativa, fragmentos y análogos son especies el género polipéptido.

30 La terminología "X#Y" en el contexto de una mutación en una secuencia polipeptídica se reconoce en la técnica, en la que "#" indica la ubicación de la mutación en cuanto al número de aminoácido del polipéptido, "X" indica el aminoácido encontrado en esa posición en la secuencia de aminoácidos de tipo natural e "Y" indica el aminoácido mutante en esa posición. Por ejemplo, la notación "G12S" con referencia al polipéptido de K-ras indica que hay una glicina en el aminoácido número 12 de la secuencia de K-ras de tipo natural y que se reemplaza la glicina por una serina en la secuencia de K-ras mutante.

35 Los términos "polipéptido de K-ras mutante" y "proteína K-ras mutante" se usan de manera intercambiable, y se refieren a un polipéptido de K-ras que comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada de G12S, G12V, G12D, G12A, G12e, G13A y G13D. Determinados polipéptidos de K-ras mutantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas, variantes de corte y empalme, variantes de derivados, variantes de sustitución, variantes de delección y/o variantes de inserción, polipéptidos de fusión, ortólogos y homólogos interespecie. En determinadas realizaciones, un polipéptido de K-ras mutante incluye residuos adicionales en el extremo C o N-terminal, tales como, pero sin limitarse a, residuos de secuencias líder, residuos de direccionamiento, residuos de metionina amino-terminales, residuos de lisina, residuos de etiqueta y/o residuos de proteínas de fusión.

40 Los términos "polipéptido de B-raf mutante" y "proteína B-raf mutante" se usan de manera intercambiable, y se refieren a un polipéptido de B-raf que comprende una mutación V600E. Determinados polipéptidos de B-raf mutantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas, variantes de corte y empalme, variantes de derivados, variantes de sustitución, variantes de delección y/o variantes de inserción, polipéptidos de fusión, ortólogos y homólogos interespecie. En determinadas realizaciones, un polipéptido de B-raf mutante incluye residuos adicionales en el extremo e o N-terminal, tales como, pero sin limitarse a, residuos de secuencias líder, residuos de direccionamiento, residuos de metionina amino-terminales, residuos de lisina, residuos de etiqueta y/o residuos de proteínas de fusión.

45 El término "que se produce de manera natural" tal como se usa en el presente documento tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado a propósito por el hombre en el laboratorio o de otra forma se produce de manera natural.

50 El término "operativamente unido" tal como se usa en el presente documento se refiere a la colocación de componentes de manera que estén en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia

de control "operativamente unida" a una secuencia codificante se liga de un modo tal que se logra la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control.

5 El término "secuencia de control" tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión al ribosoma y secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotes, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de pareja de fusión.

15 El término "polinucleótido" tal como se hace referencia en el presente documento significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, o bien ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN.

20 El término "oligonucleótido" al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos modificados y que se producen de manera natural unidos entre sí por enlaces oligonucleotídicos que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprende generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud y lo más preferiblemente de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son habitualmente monocatenarios, por ejemplo para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos o bien sentido o bien antisentido.

30 Los términos "polinucleótido de K-ras mutante", "oligonucleótido K-ras mutante" y "ácido nucleico de K-ras mutante" se usan de manera intercambiable, y se refieren a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de K-ras que comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada de G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A y G13D.

Los términos "polinucleótido de B-raf mutante", "oligonucleótido B-raf mutante" y "ácido nucleico de B-raf mutante" se usan de manera intercambiable, y se refieren a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de B-raf que comprende una mutación V600E.

35 El término "nucleótidos que se producen de manera natural" al que se hace referencia en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos con grupos azúcar sustituidos o modificados y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" al que se hace referencia en el presente documento incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares. Véanse por ejemplo, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984); Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon *et al.* Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford Inglaterra (1991)); Stec *et al.* patente estadounidense n.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990), cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia. Un oligonucleótido puede incluir un marcador para su detección, si se desea.

50 El término "hibridarse selectivamente" al que se hace referencia en el presente documento significa unirse de manera detectable y específica. Polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos se hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectiva tal como se conoce en la técnica y se comenta en el presente documento. Generalmente, la homología de secuencia de ácido nucleico entre polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos el 80%, y más normalmente con homologías preferiblemente crecientes de al menos el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% y el 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología del 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para lograr una coincidencia máxima. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que están haciéndose coincidir) en la maximización de la coincidencia; se prefieren longitudes de hueco de 5 o menos prefiriéndose más 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias de proteína (o secuencias polipeptídicas derivadas de las mismas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como se usa este término en el presente documento, si tienen una puntuación de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por hueco de 6 o más. Véase Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (volumen 5, National

Biomedical Research Foundation (1972)) y suplemento 2 a ese volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son más de o igual al 50% idénticos cuando se alinean de manera óptima usando el programa ALIGN. El término "corresponde a" se usa en el presente documento queriendo decir que una secuencia de polinucleótido es homóloga (es decir, es idéntica, no relacionada evolutivamente de manera estricta) a toda o una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia. En contraposición, el término "complementario a" se usa en el presente documento queriendo decir que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de aminoácidos o polinucleótido: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de una secuencia génica o de ADNc de longitud completa facilitado en una lista de secuencias o puede comprender una secuencia génica o de ADNc completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, o al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos de longitud, o al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Puesto que dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, una parte de la secuencia de aminoácidos o de polinucleótido completa) que es similar entre las dos moléculas, y (2) puede comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos, se realizan normalmente comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas comparando secuencias de las dos moléculas a lo largo de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótido contiguas o 6 aminoácidos en los que puede compararse una secuencia de polinucleótido o secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o secuencias de 6 aminoácidos y en los que la parte de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones, deleciones, sustituciones, y similares (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para lograr una alineación óptima de las dos secuencias. Puede realizarse la alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones por ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), paquetes de software de Geneworks o MacVector), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología a lo largo de la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de aminoácidos o de polinucleótido son idénticas (es decir, en una base nucleótido-a-nucleótido o residuo-a-residuo) a lo largo de la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo o la base de ácido nucleico idéntico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" tal como se usa en el presente documento indica una característica de una secuencia de aminoácidos o de polinucleótido, en la que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos del 90 al 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótido (6 aminoácidos), frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótido (8-16 aminoácidos), en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que totalizan el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2ª edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que se incorpora en el presente documento como referencia. El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a L-aminoácidos o a D-aminoácidos que se producen de manera natural. Se usan en el presente documento las abreviaturas de una y tres letras

comúnmente usadas (Bruce Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., Nueva York (4ª ed. 2002)). Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales pueden ser también componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, o-N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, la dirección a mano izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección a mano derecha es la dirección carboxilo-terminal, según la convención y el uso convencional.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo a mano izquierda de secuencias de polinucleótido monocatenarias es el extremo 5'; la dirección a mano izquierda de secuencias de polinucleótido bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. Regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' en el transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 5'". Regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 3'".

Tal como se aplica a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de huecos por defecto, comparten al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos el 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos el 95, el 96, el 97 o el 98 por ciento de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferiblemente, posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Tal como se comenta en el presente documento, se contempla que variaciones minoritarias en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina están abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, el 90%, el 95% y lo más preferiblemente el 99%. Sustituciones de aminoácidos conservativas son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en familias: (1) ácidos=aspartato, glutamato; (2) básicos=lisina, arginina, histidina; (3) no polares=alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados=glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Familias más preferidas son: serina y treonina son una familia alifática-de hidroxilo; asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; fenilalanina, triptófano y tirosina son una familia aromática, y cisteína y metionina como una familia de cadena lateral que contiene azufre. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido dentro de un sitio de entramado. Grupos de sustitución de aminoácidos conservativos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido glutámico-ácido aspártico, cisteína-metionina y asparagina-glutamina.

Sustituciones de aminoácidos preferidas son las que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica que se produce de manera natural. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (preferiblemente en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácido conservativa no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original, o romper otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* Nature 354: 105 (1991), que se incorporan cada una en el presente documento como referencia.

El término "análogo" tal como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos que están compuestos por un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido que se produce de manera natural y que tiene al menos una de las actividades del polipéptido que se produce de manera natural. Normalmente, los análogos de polipéptido comprenden una sustitución de aminoácido conservativa (o adición o delación) con respecto a la secuencia que se produce de manera natural. Los análogos tienen normalmente al menos 20 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos

50 aminoácidos de longitud o más, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido que se produce de manera natural de longitud completa.

5 Se usan comúnmente análogos peptídicos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Esos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15: 29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* p. 392 (1985); y Evans *et al.* *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987), que se incorporan en el presente documento como referencia. Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular por ordenador. Pueden usarse miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto profiláctico o terapéutico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-, mediante métodos bien conocidos en la técnica. Puede usarse la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un O-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, O-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), incorporado en el presente documento como referencia); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

25 Se producen extremos amino y carboxilo-terminales preferidos de fragmentos o análogos cerca de los límites de dominios funcionales. Pueden identificarse dominios estructurales y funcionales mediante comparación de los datos de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias registradas o públicas. Preferiblemente, se usan métodos de comparación por ordenador para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteínas pronosticados que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteína que se pliegan para dar una estructura tridimensional conocida (véase Bowie *et al.* *Science* 253: 164 (1991)). Los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales según la invención.

35 El término "agente de unión específica" se refiere a una molécula natural o no natural que se une específicamente a una diana. Los ejemplos de agentes de unión específica incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos y compuestos de molécula pequeña. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica es un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica es una región de unión a antígeno.

40 El término "agente de unión específica a un polipéptido de EGFr" se refiere a un agente de unión específica que se une específicamente a cualquier parte de un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr es un anticuerpo frente a un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr es una región de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr es un anticuerpo frente a EGFr. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr es panitumumab.

45 El término "agente de unión específica a un polipéptido de K-ras mutante" se refiere a un agente de unión específica que se une específicamente a cualquier parte de un polipéptido de K-ras mutante. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de K-ras mutante es un anticuerpo frente a un polipéptido de K-ras mutante. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de K-ras mutante es una región de unión a antígeno.

50 El término "agente de unión específica a un polipéptido de B-raf mutante" se refiere a un agente de unión específica que se une específicamente a cualquier parte de un polipéptido de B-raf mutante. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de B-raf mutante es un anticuerpo frente a un polipéptido de B-raf mutante. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de B-raf mutante es una región de unión a antígeno.

60 El término "se une específicamente" se refiere a la capacidad de un agente de unión específica para unirse a una diana con mayor afinidad de la que se une a una molécula no diana. En determinadas realizaciones, unión específica se refiere a la unión a una diana con una afinidad que es al menos 10, 50, 100, 250, 500 ó 1000 veces mayor que la afinidad por una molécula no diana. En determinadas realizaciones, se determina la afinidad mediante un ensayo ELISA de afinidad. En determinadas realizaciones, se determina la afinidad mediante un ensayo BIAcore. En determinadas realizaciones, se determina la afinidad mediante un método cinético. En determinadas realizaciones, se determina la afinidad mediante un método de equilibrio/disolución. En determinadas realizaciones,

se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación entre el anticuerpo y uno o más de sus epítomos reconocidos es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$ y lo más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$.

5 "Inmunoglobulinas y anticuerpos nativos", en determinados casos, son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intracatenarios espaciados
10 regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de la cadena ligera y la pesada (Chothia *et al.* J. Mol. Biol. 186: 651 (1985); Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 4592 (1985); Chothia *et al.*, Nature 342: 877-883 (1989)).

El término "anticuerpo" se refiere a tanto un anticuerpo intacto como a un fragmento de unión a antígeno del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. "Fragmento de unión a antígeno del mismo" se refiere a una parte o fragmento de una molécula de anticuerpo intacto, conservando el fragmento la función de unión a antígeno. Se producen fragmentos de unión mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión química o enzimática de anticuerpos intactos tal como mediante escisión con papaína. Los fragmentos de unión incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de una única cadena ("scFv"), Fd' y Fd. Los expertos en la técnica conocen bien métodos para producir los diversos fragmentos a partir de anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Pluckthun, 1992, Immunol. Rev. 130: 151-188). Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idéntico. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un receptor a un contrarceptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contrarceptor en al menos aproximadamente el 20%, el 40%, el 60% o el 80%, y más habitualmente más de aproximadamente el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% (tal como se mide en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).
20
25
30

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 terapéuticos o de diagnóstico para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas u otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo tal como se determina mediante el método de Lowry, y secuenciación de aminoácidos internos o terminales mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
35
40

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios de cadena ligera como en los de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan el entramado (FR "*framework*"). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones de FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las regiones de FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat *et al.* (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo.
45
50
55

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y reconocimiento de antígeno completo. En una especie de Fv de dos cadenas, esta región comprende un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. En una especie de Fv de una única cadena, a un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera puede unírsele covalentemente un ligador peptídico flexible de manera que las cadenas pesadas y ligeras pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente,
60

las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a un antígeno, aunque a una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

5 El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente
10 residuos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo los residuos 24-34 (L 1), 50-62 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-55 (H1), 5Q-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 58 Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol196: 901-917 (1987)). Residuos de "región de entramado" o "FR" son residuos de dominios variables distintos de los residuos de regiones hipervariables tal como se define en el presente documento.

15 El término "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR", cuando se usa en el presente documento, se refiere a partes de receptores inmunológicos que entran en contacto con un ligando específico y determinan su especificidad. Las CDR de receptores inmunológicos son la parte más variable de la proteína receptora, que proporcionan a los receptores su diversidad, y se portan en seis bucles en el extremo distal de los dominios variables del receptor, procediendo tres bucles de cada uno de los dos dominios variables del receptor.

20 "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fe (FcR) (por ejemplo linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII sólo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fe sobre células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol19:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente estadounidense n.º 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para
25 tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativa o adicionalmente, puede evaluarse la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95:652-656 (1988).

30 El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico que pueda unirse específicamente a una inmunoglobulina y/o receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen habitualmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

35 El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

40 Tal como se usa en el presente documento, los términos "etiqueta" o "etiquetado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante incorporación de un aminoácido radioetiquetado o unión a un polipéptido de restos biotinilo que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). En determinadas situaciones, la etiqueta o el marcador pueden ser también terapéuticos. En la técnica se conocen y pueden usarse diversos métodos de etiquetado de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁶S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánido), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa del rábano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotinilo y epítipos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de parejas de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas). En algunas realizaciones, las etiquetas se unen
45 mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

50 El término "fármaco o agente terapéutico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente. Otros términos de química en el presente documento se usan según el uso convencional en la técnica, tal como se muestra a modo de ejemplo por The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)), incorporado en el presente documento como referencia.

60

El término "agente antineoplásico" se usa en el presente documento para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir un desarrollo o progresión de un neoplasma en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. La inhibición de la metástasis es frecuentemente una propiedad de agentes antineoplásicos. En determinadas realizaciones, un agente antineoplásico es panitumumab.

Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objetiva es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objetiva comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, el 90%, el 95%, el 96, el 97, el 98 o el 99%. Lo más preferiblemente, la especie objetiva se purifica hasta la homogeneidad esencial (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales) consistiendo esencialmente la composición en una única especie macromolecular.

El término paciente incluye sujetos humanos y animales.

Los términos "mamífero" y "animal" para fines de tratamiento se refieren a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, de deportes o de mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

El término "estado patológico" se refiere a un estado fisiológico de una célula o de un mamífero completo en el que se ha producido una interrupción, cese o trastorno de funciones, sistemas u órganos celulares o corporales.

Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a tanto tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un trastorno o cambio fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o la diseminación del cáncer. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, reducción del grado de enfermedad, estabilización (es decir, que no empeora) del estado de enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el estado o trastorno así como los propensos a tener el estado o trastorno o aquellos en los que va a prevenirse el estado o trastorno.

El término "sensible" tal como se usa en el presente documento significa que un paciente o tumor muestra una respuesta completa o una respuesta parcial tras la administración de un agente, según RECIST (criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos, "*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*"). El término "no sensible" tal como se usa en el presente documento significa que un paciente o tumor muestra enfermedad estable o enfermedad progresiva tras la administración de un agente, según RECIST. Se describe RECIST, por ejemplo, en Therasse *et al.*, febrero de 2000, "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors," J. Natl. Cancer Inst. 92(3): 205-216, que se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad. Los agentes a modo de ejemplo incluyen agentes de unión específica a un polipéptido de EGFr, incluyendo pero sin limitarse a, anticuerpos frente a EGFr.

Un "trastorno" es cualquier estado que se beneficiaría de uno o más tratamientos. Esto incluye enfermedades o trastornos crónicos y agudos incluyendo los estados patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitativos de trastornos que van a tratarse en el presente documento incluyen tumores benignos y malignos, leucemias y tumores malignos linfoides, en particular cáncer de mama, rectal, de ovario, de estómago, endometrial, de glándulas salivales, de riñón, de colon, de tiroides, pancreático, de próstata o de vejiga. Un trastorno preferido que va a tratarse según la presente invención es un tumor maligno, tal como carcinomas de cuello uterino y neoplasia glandular y escamosa intraepitelial de cuello uterino, carcinoma de células renales (RCC), tumores esofágicos y líneas celulares derivadas de carcinoma.

Una "enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de EGFr" incluye uno o más de los siguientes: una enfermedad o estado provocado por un polipéptido de EGFr; una enfermedad o estado al que contribuye un polipéptido de EGFr; y una enfermedad o estado que está asociado con la presencia de un polipéptido de EGFr. En determinadas realizaciones, una enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de EGFr es un cáncer. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinomas de mama, de colon, gástrico, de cerebro, de vejiga, de cabeza y cuello, de varío v de próstata.

Una "enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de K-ras mutante" incluye uno o más de los siguientes: una enfermedad o estado provocado por un polipéptido de K-ras mutante; una enfermedad o estado al que contribuye un polipéptido de K-ras mutante; una enfermedad o estado que provoca un polipéptido de K-ras mutante; y una enfermedad o estado que está asociado con la presencia de un polipéptido de K-ras mutante. En determinadas realizaciones, la enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de K-ras mutante puede existir en ausencia del polipéptido de K-ras mutante. En determinadas realizaciones, la enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de K-ras mutante puede agravarse por la presencia de un polipéptido de K-ras mutante. En determinadas realizaciones, una enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de K-ras mutante es un cáncer. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinomas de mama, de colon, gástrico, de cerebro, de vejiga, de cabeza y cuello, de ovario y de próstata.

Una "enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de B-raf mutante" incluye no o más de los siguientes: una enfermedad o estado provocado por un polipéptido de B-raf mutante; una enfermedad o estado al que contribuye un polipéptido de B-raf mutante; una enfermedad o estado que provoca un polipéptido de B-raf mutante; y una enfermedad o estado que está asociado con la presencia de un polipéptido de B-raf mutante. En determinadas realizaciones, la enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de B-raf mutante puede existir en ausencia de la mutación. En determinadas realizaciones, la enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de B-raf mutante puede agravarse por la presencia de un polipéptido de B-raf mutante. En determinadas realizaciones, una enfermedad o estado relacionado con un polipéptido de B-raf mutante es un cáncer. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinomas de mama, de colon, gástrico, de cerebro, de vejiga, de cabeza y cuello, de ovario y de próstata.

En "terapia combinada", se tratan pacientes con un agente de unión específica para un antígeno diana en combinación con un agente quimioterápico o antineoplásico y/o radioterapia. En determinadas realizaciones, el agente de unión específica es panitumumab. Los diseños de protocolos abordaran la eficacia tal como se evalúa mediante la reducción en la masa tumoral así como la capacidad para reducir las dosis habituales de quimioterapia convencional. Estas reducciones de la dosificación permitirán una terapia adicional y/o prolongada reduciendo la toxicidad relacionada con la dosis del agente quimioterápico.

"Monoterapia" se refiere al tratamiento de un trastorno administrando inmunoterapia a pacientes sin un agente quimioterápico o antineoplásico acompañante. En determinadas realizaciones, la monoterapia comprende administrar panitumumab en ausencia de un agente quimioterápico o antineoplásico y/o radioterapia.

35 **Determinadas realizaciones**

En determinadas realizaciones, se proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras en un sujeto. En determinadas realizaciones, se da a conocer un método de diagnóstico de una enfermedad o estado que está relacionado con una o s mutaciones de B-raf en un sujeto.

En determinadas realizaciones de la descripción, un método de diagnóstico de una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras en un sujeto comprende: (a) determinar la presencia o cantidad de expresión de un polipéptido de K-ras mutante en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras basándose en la presencia o cantidad de expresión del polipéptido. En determinadas realizaciones de la descripción, un método de diagnóstico de una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras en un sujeto comprende: (a) determinar la presencia o cantidad de transcripción o traducción de un polinucleótido de K-ras mutante en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras basándose en la presencia o cantidad de transcripción o traducción del polinucleótido. En determinadas realizaciones de la descripción, la enfermedad o estado es cáncer.

En determinadas realizaciones de la descripción, un método de diagnóstico de una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras en un sujeto comprende: (a) determinar la presencia o cantidad de expresión de un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16; y (b) diagnosticar una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras basándose en la presencia o cantidad de expresión del polipéptido. En determinadas realizaciones de la descripción, un método de diagnóstico de una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras en un sujeto comprende: (a) determinar la presencia o cantidad de transcripción o traducción de un polinucleótido que codifica para al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16 en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de K-ras basándose en la presencia o

sujeto comprende: (a) determinar la presencia o cantidad de transcripción o traducción de un polinucleótido de B-raf mutante en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una susceptibilidad a una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de B-raf basándose en la presencia o cantidad de transcripción o traducción del polinucleótido. En determinadas realizaciones de la descripción, la enfermedad o es do es cáncer.

5 En determinadas realizaciones de la descripción, un método de diagnóstico de una susceptibilidad a una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de B-raf en un sujeto comprende: (a) determinar la presencia o cantidad de expresión de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una susceptibilidad a una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de B-raf basándose en la presencia o cantidad de expresión del polipéptido. En determinadas realizaciones de la descripción, un método de diagnóstico de una susceptibilidad a una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de B-raf en un sujeto comprende: (a) determinar la presencia o cantidad de transcripción o traducción de un polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una susceptibilidad a una enfermedad o estado que está relacionado con una o más mutaciones de B-raf basándose en la presencia o cantidad de transcripción o traducción del polipéptido. En determinadas realizaciones de la descripción, la enfermedad o estado es cáncer.

20 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de determinación de la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica para un polipéptido de K-ras mutante. En determinadas realizaciones de la descripción, un método de determinación de la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica para un polipéptido de K-ras mutante en una muestra comprende (a) exponer una muestra a una sonda que se hibrida con un polinucleótido que codifica para una región de un polipéptido de K-ras mutante, en el que la región comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada de G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A y G13D, y (b) determinar la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica para un polipéptido de K-ras mutante en la muestra. En determinadas realizaciones de la descripción, un método de determinación de la presencia o ausencia de un polipéptido de K-ras mutante en una muestra comprende (a) exponer una muestra a una sonda que se hibrida con un polinucleótido que codifica para una región de un polipéptido de K-ras mutante, en el que la región comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada de G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A y G13D, y (b) determinar la presencia o ausencia de un polipéptido de K-ras mutante en la muestra.

35 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de determinación de la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica para un polipéptido de B-raf mutante. En determinadas realizaciones de la descripción, un método de determinación de la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica para un polipéptido de B-raf mutante en una muestra comprende (a) exponer una muestra a una sonda que se hibrida con un polinucleótido que codifica para una región de un polipéptido de B-raf mutante, en el que la región comprende una mutación V600E, y (b) determinar la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica para un polipéptido de B-raf mutante en la muestra. En determinadas realizaciones de la descripción, un método de determinación de la presencia o ausencia de un polipéptido de B-raf mutante en una muestra comprende (a) exponer una muestra a una sonda que se hibrida con un polinucleótido que codifica para una región de un polipéptido de B-raf mutante, en el que la región comprende una mutación V600E, y (b) determinar la presencia o ausencia de un polipéptido de B-raf mutante en la muestra.

45 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método para establecer un perfil de población de K-ras mutante en una población específica de individuos que comprende: (a) determinar la presencia de al menos una mutación de K-ras en un perfil genético de los individuos en una población; y (b) establecer una relación entre los perfiles genéticos de K-ras mutante y los individuos. En determinadas de tales realizaciones de la descripción, las características específicas de los individuos incluyen una susceptibilidad a desarrollar una enfermedad o estado que está relacionado con una mutación de K-ras. En determinadas de tales realizaciones, las características específicas de los individuos incluyen presentar una enfermedad o estado que está relacionado con una mutación de K-ras.

55 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras G12S en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.

60 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras G12V en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.

- 5 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras G12D en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.
- 10 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras G12A en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.
- 15 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras G12C en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.
- 20 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras G13A en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.
- 25 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras G13D en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.
- 30 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en el aminoácido 12 de K-ras y/o el aminoácido 13 de K-ras en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.
- 35 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un kit para detectar un polinucleótido que codifica para un polipéptido de K-ras mutante en un sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el kit comprende una sonda que se hibrida con un polinucleótido que codifica para una región de un polipéptido de K-ras mutante, en el que la región comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada de G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A y G13D. En determinadas realizaciones de la descripción, el kit comprende además dos o más cebadores de amplificación. En determinadas realizaciones de la descripción, el kit comprende además un componente de detección. En determinadas realizaciones de la descripción, el kit comprende además un componente de muestreo de ácido nucleico.
- 40 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método para establecer un perfil de población de B-raf mutante en una población específica de individuos que comprende: (a) determinar la presencia de al menos una mutación de B-raf en un perfil genético de los individuos en una población; y (b) establecer una relación entre los perfiles genéticos de B-raf mutante y los individuos. En determinadas de tales realizaciones de la descripción, las características específicas de los individuos incluyen una susceptibilidad a desarrollar una enfermedad o estado que está relacionado con una mutación de B-raf. En determinadas de tales realizaciones de la descripción, las características específicas de los individuos incluyen presentar una enfermedad o estado que está relacionado con una mutación de B-raf.
- 45 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de predicción de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de B-raf V600E en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.
- 50 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un método de determinación de la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr en un sujeto que padece cáncer, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de B-raf en el aminoácido 600 de B-raf en el sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el anticuerpo es panitumumab.
- 55 En determinadas realizaciones de la descripción, se proporciona un kit para detectar un polinucleótido que codifica para un polipéptido de B-raf mutante en un sujeto. En determinadas de tales realizaciones, el kit comprende una sonda que se hibrida con un polinucleótido que codifica para una región de un polipéptido de B-raf mutante, en el que la región comprende una mutación V600E. En determinadas realizaciones de la descripción, el kit comprende además dos o más cebadores de amplificación. En determinadas realizaciones de la descripción, el kit comprende
- 60

además un componente de detección. En determinadas realizaciones de la descripción, el kit comprende además un componente de muestreo de ácido nucleico.

5 En determinadas realizaciones de la descripción, se determina la insensibilidad al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr usando RECIST (criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos). Una respuesta completa y una respuesta parcial según RECIST se considera que son ambas sensibles al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. La enfermedad estable y la enfermedad progresiva se considera que son ambas insensibles al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. RECIST se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en Therasse *et al.*, febrero de 10 2000, "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors," J. Natl. Cancer Inst. 92 (3): 205-216.

15 En determinadas realizaciones, se detecta una mutación de K-ras y/o una mutación de B-raf. En determinadas realizaciones, se detecta una mutación de K-ras y/o una mutación de B-raf detectando el polinucleótido de K-ras mutante y/o el polinucleótido de B-raf mutante. En determinadas realizaciones, se detecta una mutación de K-ras y/o una mutación de B-raf detectando el polipéptido de K-ras mutante y/o el polipéptido de B-raf mutante.

20 Se conocen en la técnica determinados métodos de detección de una mutación en un polinucleótido. Determinados de tales métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, secuenciación, reacciones de extensión del cebador, electroforesis, ensayos Picogreen, ensayos de ligamiento de oligonucleótidos, ensayos de hibridación, ensayos TaqMan, ensayos SNPlex y ensayos descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.470.705, 5.514.543, 5.580.732, 5.624.800, 5.807.682, 6.759.202, 6.756.204, 6.734.296, 6.395.486 y la publicación de patente estadounidense n.º US 2003-0190646 A1.

25 En determinadas realizaciones, la detección de una mutación en un polinucleótido comprende amplificar en primer lugar un polinucleótido que puede comprender la mutación. Se conocen en la técnica determinados métodos para amplificar un polinucleótido. Tales productos de amplificación pueden usarse en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, o conocidos en la técnica, para detectar una mutación en un polinucleótido.

30 Se conocen en la técnica determinados métodos de detección de una mutación en un polipéptido. Determinados de tales métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, detección usando un agente de unión específica específico para el polipéptido mutante. Otros métodos de detección de un polipéptido mutante incluyen, pero no se limitan a, electroforesis y secuenciación de péptidos.

35 Se describen determinados métodos a modo de ejemplo de detección de una mutación en un polinucleótido y/o un polipéptido, por ejemplo, en Schimanski *et al.* (1999) Cancer Res., 59: 5169-5175; Nagasaka *et al.* (2004) J. Clin. Oncol., 22: 4584-4596; publicación PCT n.º WO 2007/001868 A1; publicación de patente estadounidense n.º 2005/0272083 A1; y Lievre *et al.* (2006) Cancer Res. 66: 3992-3994.

40 En determinadas realizaciones, se proporcionan microalineamientos que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican para uno o más polipéptidos de K-ras mutantes. En determinadas realizaciones, se proporcionan microalineamientos que comprenden uno o más polinucleótidos complementarios a uno o más polinucleótidos que codifican para uno o más polipéptidos de K-ras mutantes. En determinadas realizaciones, se proporcionan microalineamientos que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican para uno o más polipéptidos de B-raf mutantes. 45 En determinadas realizaciones, se proporcionan microalineamientos que comprenden uno o más polinucleótidos complementarios a uno o más polinucleótidos que codifican para uno o más polipéptidos de B-raf mutantes.

50 En determinadas realizaciones, se evalúa la presencia o ausencia de uno o más polinucleótidos de K-ras mutantes en dos o más muestras celulares o tisulares usando tecnología de microalineamientos. En determinadas realizaciones, se evalúa la cantidad de uno o más polinucleótidos de K-ras mutantes en dos o más muestras celulares o tisulares usando tecnología de microalineamientos.

55 En determinadas realizaciones, se evalúa la presencia o ausencia de uno o más polinucleótidos de B-raf mutantes en dos o más muestras celulares o tisulares usando tecnología de microalineamientos. En determinadas realizaciones, se evalúa la cantidad de uno o más polinucleótidos de B-raf mutantes en dos o más muestras celulares o tisulares usando tecnología de microalineamientos.

60 En determinadas realizaciones, se evalúa la presencia o ausencia de uno o más polipéptidos de K-ras mutantes en dos o más muestras celulares o tisulares usando tecnología de microalineamientos. En determinadas de tales realizaciones, se extrae en primer lugar ARNm de una muestra celular o tisular y posteriormente se convierte en ADNc, que se hibrida con el microalineamiento. En determinadas de tales realizaciones, la presencia o ausencia de ADNc que se une específicamente al microalineamiento es indicativa de la presencia o ausencia del polipéptido de

K-ras mutante. En determinadas de tales realizaciones, se evalúa el nivel de expresión del uno o más polipéptidos de K-ras mutantes cuantificando la cantidad de ADNc que se une específicamente al microalineamiento.

5 En determinadas realizaciones, se evalúa la presencia o ausencia de uno o más polipéptidos de B-raf mutantes en dos o más muestras celulares o tisulares usando tecnología de microalineamientos. En determinadas de tales realizaciones, se extrae en primer lugar ARNm de una muestra celular o tisular y posteriormente se convierte en ADNc, que se hibrida con el microalineamiento. En determinadas de tales realizaciones, la presencia o ausencia de ADNc que se une específicamente al microalineamiento es indicativa de la presencia o ausencia del polipéptido de B-raf mutante. En determinadas de tales realizaciones, se evalúa el nivel de expresión del uno o más polipéptidos de B-raf mutantes cuantificando la cantidad de ADNc que se une específicamente al microalineamiento.

10 En determinadas realizaciones, se proporcionan microalineamientos que comprenden uno o más agentes de unión específica a uno o más polipéptidos de K-ras mutantes. En determinadas de tales realizaciones, se evalúa la presencia o ausencia de uno o más polipéptidos de K-ras mutantes en una célula o tejido. En determinadas de tales realizaciones, se evalúa la cantidad de uno o más polipéptidos de K-ras mutantes en una célula o tejido.

15 En determinadas realizaciones, se proporcionan microalineamientos que comprenden uno o más agentes de unión específica a uno o más polipéptidos de B-raf mutantes. En determinadas de tales realizaciones, se evalúa la presencia o ausencia de uno o más polipéptidos de B-raf mutantes en una célula o tejido. En determinadas de tales realizaciones, se evalúa la cantidad de uno o más polipéptidos de B-raf mutantes en una célula o tejido.

20 Los siguientes ejemplos, que incluyen los experimentos realizados y los resultados logrados, se proporcionan para un fin ilustrativo sólo y no deben interpretarse como limitativos de las reivindicaciones.

25 Ejemplos

Ejemplo 1

30 Respuesta del cáncer colorrectal metastásico al tratamiento con panitumumab

Se incluyeron tumores de 25 pacientes con cáncer colorrectal metastásico en ensayos clínicos de panitumumab (Amgen, Thousand Oaks, CA). Todos los pacientes tenían cáncer colorrectal metastásico que expresaba EGFr y un 1% o más de células malignas que se teñían para EGFr mediante análisis inmunohistoquímico con el kit EGFRPharmDX de DAKO (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca).

35 Los pacientes recibieron 6 mg/kg de panitumumab por vía intravenosa cada 2 semanas hasta la progresión como tratamiento de tercera línea o de cuarta línea para pacientes resistentes a regímenes de oxaliplatino e irinotecán. Se evaluó la respuesta del tumor usando CT o IRM y se analizó estadísticamente usando RECIST (criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos), que proporciona directrices para identificar una respuesta completa, una respuesta parcial, enfermedad estable o enfermedad progresiva basándose en el tamaño tumoral (véase, por ejemplo, Therasse *et al.*, febrero de 2000, "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors," J. Natl. Cancer Inst. 92(3): 205-216).

40 De los 25 pacientes, 4 mostraron una respuesta parcial al tratamiento, 8 mostraron enfermedad estable y 13 mostraron enfermedad progresiva, tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Características clínicas de pacientes con cáncer colorrectal metastásico tratados con panitumumab

Id de pacientes	Edad	Sexo	Línea de tratamiento para enfermedad metastásica	Respuesta del tumor	
				Mejor respuesta	Duración (semanas)
1	59	M	4 ^a	RP	31
2	62	F	3 ^a	RP	23
3	57	M	3 ^a	EE	15
4	78	F	4 ^a	RP	24
5	63	M	3 ^a	RP	15
6	71	M	3 ^a	EE	32
7	60	M	4 ^a	EE	24
8	58	M	4 ^a	EP	NA
9	68	M	4 ^a	EE	23
10	56	M	2 ^a	EP	NA
11	67	F	3 ^a	EP	NA
12	54	M	3 ^a	EP	NA
13	65	F	4 ^a	EP	NA
14	57	M	4 ^a	EP	NA
15	62	F	4 ^a	EP	NA
16	46	F	3 ^a	EP	NA
17	53	F	4 ^a	EP	NA
18	67	M	3 ^a	EP	NA
19	61	M	4 ^a	EP	NA
20	70	F	4 ^a	EP	NA
21	63	F	3 ^a	EE	15
22	44	M	4 ^a	EE	16
23	47	F	3 ^a	EP	NA
24	52	F	4 ^a	EE	16
25	53	F	4 ^a	EE	31

RP =respuesta parcial; EE =enfermedad estable; EP =enfermedad progresiva

Ejemplo 2

Análisis mutacional de K-ras, B-raf y EGFR en pacientes con cáncer colorrectal metastásico

Para determinar si mutaciones de K-ras, B-raf y/o EGFR se correlacionaban con la respuesta del cáncer colorrectal metastásico a panitumumab, se secuenciaron el exón 2 de K-ras, los exones 15 y 21 de B-raf y los exones 9 y 20 de EGFR de cada paciente.

Para cada paciente, se prepararon muestras incrustadas en parafina de 10 micrómetros. Se desparafinaron secciones de dos micrómetros, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron para determinar la morfología detallada. Se marcaron regiones que presentaban tejido tumoral y se extrajo el ADN del tejido tal como se describe en Moroni *et al.* Lancet Oncol. 6: 279-286 (2005).

Se diseñaron cebadores específicos de exones y cebadores de secuenciación usando el software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) y se sintetizaron por Invitrogen. Se amplificaron el exón 2 de K-ras, los exones 15 y 21 de B-raf y los exones 9 y 20 de EGFR mediante PCR usando cebadores específicos para cada exón. Un experto en la técnica puede diseñar cebadores apropiados usando las secuencias génicas para K-ras y B-raf.

Se muestra la secuencia polipeptídica de K-ras de tipo natural en la figura 2A (SEQ ID NO: 2; n.º de registro de Genbank NP_004976). Se muestra también la secuencia de ADNc de K-ras de tipo natural en la figura 2A (SEQ ID NO: 1; n.º de registro de Genbank NM_004985). Se encuentra la secuencia de nucleótidos de K-ras de tipo natural genómica en el n.º de registro de Genbank NM_004985.

Se muestra la secuencia polipeptídica de B-raf de tipo natural en la figura 38 (SEQ ID NO: 18; n.º de registro de Genbank NP_004324). Se muestra la secuencia de ADNc de B-raf de tipo natural en la figura 3A (SEQ ID NO: 17;

n.º de registro de Genbank NM_004333). Se encuentra la secuencia de nucleótidos de B-raf de tipo natural genómica, por ejemplo, en el n.º de registro de Genbank NT_007914.14.

5 Se muestra la secuencia polipeptídica de EGFr de tipo natural, por ejemplo en la publicación PCT n.º WO 2006/091899 A1 en la figura 6C (n.º de registro de Genbank AAS83109). Se muestra la secuencia de ADNc de EGFr de tipo natural, por ejemplo en la publicación PCT n.º WO 2006/091899 A1 en las figuras 6A y 68 (n.º de registro de Genbank AC006977). Se encuentra la secuencia de nucleótidos de EGFr de tipo natural genómica en el n.º de registro de Genbank AC073324.

10 Se llevó a cabo la PCR en un volumen de 20 µl usando un programa de PCR con rampa decreciente de temperaturas (PCR "touchdown") en condiciones descritas anteriormente para amplificar regiones específicas de exones a partir de ADN genómico del tumor. Véase, por ejemplo, Bardelli *et al.*, Science 300: 949 (2003). Se secuenciaron productos de PCR purificados usando el kit de secuenciación de ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y se analizaron en un sistema de electroforesis capilar 3730 A81. El tejido tumoral del paciente 15 estaba limitado en cantidad y el análisis de mutaciones no fue técnicamente posible para todos los exones.

Los resultados de ese análisis se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

20

Análisis mutacional de K-ras, B-raf y EGFr de cánceres colorrectales metastásicos

Id de pacientes	Análisis de secuenciación			Mejor respuesta
	K-ras	B-raf	EGFr	
1	WT	WT	WT	RP
2	G13D	WT	WT	RP
3	G12D	WT	WT	EE
4	WT	WT	WT	RP
5	WT	WT	WT	RP
6	G12V	WT	WT	EE
7	WT	V600E	WT	EE
8	WT	WT	WT	EP
9	WT	V600E	WT	EE
10	WT	WT	WT	EP
11	G13D	WT	WT	EP
12	WT	WT	WT	EP
13	WT	V600E	WT	EP
14	G12V	WT	WT	EP
15	WT	WT	WT	EP
16	G12V	WT	WT	EP
17	G12D	WT	WT	EP
18	WT	V600E	WT	EP
19	WT	WT	WT	EP
20	G13A	WT	WT	EP
21	G12V	WT	WT	EE
22	WT	V600E	WT	EE
23	WT	V600E	WT	EP
24	G13D	WT	WT	EE
25	WT	WT	WT	EE

25 Se detectaron mutaciones de K-ras en 10 de los 25 tumores, o el 40%. Seis de esas mutaciones eran en el codón 12, y 4 eran en el codón 13.

30 Se detectaron mutaciones de B-raf en 6 de los 25 tumores, o el 24%. Todas las mutaciones de B-raf eran en el codón 600 (la mutación V599E descrita previamente). No se encontraron mutaciones de EGFr en los 25 cánceres sometidos a prueba.

35 Conjuntamente, un total del 64% de los tumores tenían una mutación en o bien K-ras o bien B-raf (pero ninguno de los tumores analizados tenían mutaciones en ambos). Sólo uno de los 16 tumores con o bien una mutación de K-ras o bien una mutación de B-raf, o el 6%, mostró una respuesta a la terapia con panitumumab. Los 15 tumores restantes con mutaciones de K-ras o B-raf, o el 94%, mostraron o bien enfermedad progresiva o bien enfermedad

estable tras la terapia con panitumumab. En cambio, 3 de los 9 tumores que carecían de una mutación de K-ras o B-raf, o el 33%, mostraron una respuesta a la terapia con panitumumab.

5 Se resumen esos datos en la figura 1. En este análisis, una mutación en el codón 12 ó 13 de K-ras o el codón 600 de B-raf se correlacionaba con insensibilidad a la terapia con panitumumab.

10 Otras realizaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención dada a conocer en el presente documento. Se pretende que toda la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren como a modo de ejemplo sólo.

Lista de secuencias

<110> Amgen Inc.

<120> MUTACIONES DE K-RAS Y B-RAF Y TERAPIA CON ANTICUERPOS ANTI-EGFR

<130> EP67067IHVSEpau

<140> no asignado aún

<141> adjunto

<150> 08 742 064.2

<151> 11-03-2008

<150> Documento PCT/US2008/003327

<151> 11-03-2008

<150> 60/906.976

<151> 13-03-2007

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 567

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctggtggcg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgac caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ctttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaaattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 2
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 85 90 95
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 100 105 110
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125
 Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160
 Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
 165 170 175
 Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
 180 185

<210> 3
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3
 atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctagtggcg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgatc caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ctttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 4
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5
 atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctgttggcg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgatc caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaatt 300

aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 6
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45
 Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 85 90 95
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 100 105 110
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125
 Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160
 Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
 165 170 175
 Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
 180 185

<210> 7
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7
 atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctgatggcg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgac caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggctctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ctttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaaattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 8
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45
 Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 85 90 95
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 100 105 110
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125
 Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
 165 170 175

Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
 180 185

<210> 9
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9
 atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctgctggcg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgac caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ctttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 10
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160 165

Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
 165 170 175

Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
 180 185

<210> 11
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11
 atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gcttgtggcg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgatc caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ctttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 12
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

ES 2 426 814 T3

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

<210> 13
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13
 atgactgaat ataaacttgt ggtagttaga gctggtgccg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgatc caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ctttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 14
 <211> 188

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctggtgacg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgatc caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240

gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggctctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tgggaattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 16
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45
 Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 85 90 95
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 100 105 110
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125
 Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160
 Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
 165 170 175
 Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
 180 185

<210> 17
 <211> 2301

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

```

atggcggcgc tgagcgggtgg cggtggtggc ggcgcgggagc cgggccaggc tctgttcaac      60
ggggacatgg agcccgaggc cggcgccggc gccggcgccg cggcctcttc ggctgcggac      120
cctgccattc cggaggaggt gtggaatata aaacaaatga ttaagttgac acaggaacat      180
atagaggccc tattggacaa atttggtggg gagcataatc caccatcaat atatctggag      240
gcctatgaag aatacaccag caagctagat gcactccaac aaagagaaca acagttattg      300
gaatctctgg ggaacggaac tgatTTTTCT gTTTctagct ctgcatcaat ggataccgTT      360
acatcttctt cctcttctag cctttcagtg ctaccttcat ctctttcagt ttttcaaaat      420
cccacagatg tggcacggag caaccccaag tcaccacaaa aacctatcgt tagagtcttc      480
ctgccaaca aacagaggac agtggtacct gcaaggTgtg gagttacagt ccgagacagt      540
ctaaagaaag cactgatgat gagaggTcta atcccagagt gctgtgctgt ttacagaatt      600
caggatggag agaagaaacc aattggtTgg gacactgata tttcctggct tactggagaa      660
gaattgcatg tggaaTgtt ggagaatgtt ccacttaca cacacaactt tgtacgaaaa      720
acgtTTTTca ccttagcatt ttgtgacttt tgtcgaaagc tgcttttcca gggtttccgc      780
tgtcaaacat gtggttataa atttcaccag cgTtTtagta cagaagTtcc actgatgtgt      840
gttaattatg accaactTga tttgctgttt gtctccaagt tctttgaaca ccaccaata      900
ccacaggaag aggcgtcctt agcagagact gccctaacat ctggatcatc cccttccgca      960
cccgcctcgg actctattgg gcccacaatt ctaccagtc cgtctccttc aaaatccatt     1020
ccaattccac agcccttccg accagcagat gaagatcatc gaaatcaatt tgggcaacga     1080
gaccgatcct catcagctcc caatgtgcat ataaacacaa tagaacctgt caatattgat     1140
gacttgatta gagaccaagg atttcgtggT gatggaggat caaccacagg tttgtctgct     1200
acccccctg cctcattacc tggctcacta actaacgtga aagccttaca gaaatctcca     1260
ggacctcagc gagaaaggaa gtcatcttca tcctcagaag acaggaatcg aatgaaaaca     1320
cttggtagac gggactcagag tgatgattgg gagattcctg atgggcagat tacagtggga     1380
caaagaattg gatctggatc atttggaaca gtctacaagg gaaagtggca tggatgatgtg     1440
gcagtgaaaa tgttgaatgt gacagcacct acacctcagc agttacaagc cttcaaaaat     1500
gaagtaggag tactcaggaa aacacgacat gtgaatatcc tactcttcat gggctattcc     1560
acaaagccac aactggctat tgTtaccag tggTgtgagg gctccagctt gtatcaccat     1620
ctccatatca ttgagaccaa atttgagatg atcaaaactta tagatattgc acgacagact     1680
gcacagggca tggattactt acacgccaag tcaatcatcc acagagacct caagagtaat     1740
aatatatttc tTcatgaaga cctcacagta aaaataggtg attttggTct agctacagtg     1800
aaatctcgat ggagTgggtc ccatcagttt gaacagTtgt ctggatccat tttgtggatg     1860
    
```

gcaccagaag tcatcagaat gcaagataaa aatccataca gctttcagtc agatgtatat 1920
 gcatttgaa ttgttctgta tgaattgatg actggacagt taccttattc aaacatcaac 1980
 aacagggacc agataatattt tatgggtggga cgaggatacc tgtctccaga tctcagtaag 2040
 gtacggagta actgtccaaa agccatgaag agattaatgg cagagtgctt caaaaagaaa 2100
 agagatgaga gaccactctt tccccaaatt ctcgccteta ttgagctgct ggccccgctca 2160
 ttgccaaaaa ttcaccgcag tgcacagaaa ccctccttga atcgggctgg tttccaaaca 2220
 gaggatttta gtctatatgc ttgtgcttct ccaaaaacac ccatccaggc aggggggatat 2280
 ggtgcttttc ctgtccactg a 2301

<210> 18
 <211> 766
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 20 25 30

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp
 35 40 45

Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu
 50 55 60

Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu
 85 90 95

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu
 115 120 125

Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val
 130 135 140

Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val phe
 145 150 155 160

Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr
 165 170 175

ES 2 426 814 T3

Val Arg Asp Ser₁₈₀ Leu Lys Lys Ala Leu₁₈₅ Met Met Arg Gly Leu₁₉₀ Ile Pro
 Glu Cys Cys₁₉₅ Ala Val Tyr Arg Ile₂₀₀ Gln Asp Gly Glu Lys₂₀₅ Lys Pro Ile
 Gly Trp₂₁₀ Asp Thr Asp Ile Ser₂₁₅ Trp Leu Thr Gly Glu₂₂₀ Glu Leu His Val
 Glu Val Leu Glu Asn Val₂₃₀ Pro Leu Thr Thr His₂₃₅ Asn Phe Val Arg Lys₂₄₀
 Thr Phe Phe Thr Leu₂₄₅ Ala Phe Cys Asp Phe₂₅₀ Cys Arg Lys Leu Leu₂₅₅ Phe
 Gln Gly Phe Arg₂₆₀ Cys Gln Thr Cys Gly₂₆₅ Tyr Lys Phe His Gln₂₇₀ Arg Cys
 Ser Thr Glu₂₇₅ Val Pro Leu Met Cys₂₈₀ Val Asn Tyr Asp Gln₂₈₅ Leu Asp Leu
 Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe₂₉₅ Glu His His Pro Ile₃₀₀ Pro Gln Glu Glu
 Ala Ser Leu Ala Glu Thr₃₁₀ Ala Leu Thr Ser Gly₃₁₅ Ser Ser Pro Ser Ala₃₂₀
 Pro Ala Ser Asp Ser₃₂₅ Ile Gly Pro Gln Ile₃₃₀ Leu Thr Ser Pro Ser₃₃₅ Pro
 Ser Lys Ser Ile₃₄₀ Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp₃₅₀ Glu Asp
 His Arg Asn₃₅₅ Gln Phe Gly Gln Arg₃₆₀ Asp Arg Ser Ser Ser₃₆₅ Ala Pro Asn
 Val His Ile Asn Thr Ile Glu₃₇₅ Pro Val Asn Ile Asp₃₈₀ Asp Leu Ile Arg
 Asp Gln Gly Phe Arg Gly₃₉₀ Asp Gly Gly Ser Thr₃₉₅ Thr Gly Leu Ser Ala₄₀₀
 Thr Pro Pro Ala Ser₄₀₅ Leu Pro Gly Ser Leu₄₁₀ Thr Asn Val Lys Ala₄₁₅ Leu
 Gln Lys Ser Pro₄₂₀ Gly Pro Gln Arg Glu₄₂₅ Arg Lys Ser Ser Ser₄₃₀ Ser Ser
 Glu Asp Arg₄₃₅ Asn Arg Met Lys Thr₄₄₀ Leu Gly Arg Arg Asp₄₄₅ Ser Ser Asp

Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly
 450 455 460
 Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val
 465 470 475 480
 Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln
 485 490 495
 Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn
 500 505 510
 Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val
 515 520 525
 Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile
 530 535 540
 Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr
 545 550 555 560
 Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp
 565 570 575
 Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile
 580 585 590
 Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His
 595 600 605
 Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val
 610 615 620
 Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr
 625 630 635 640
 Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr
 645 650 655
 Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly
 660 665 670
 Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala
 675 680 685
 Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg
 690 695 700
 Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser
 705 710 715 720

ES 2 426 814 T3

Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala
 725 730 735

Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys
 740 745 750

Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
 755 760 765

<210> 19
 <211> 2301
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19
 atggcgggcgc tgagcgggtgg cggtggtggc ggcgcgggagc cgggccaggc tctgttcaac 60
 ggggacatgg agcccgaggc cggcgccggc gccggcgccg cggcctcttc ggctgcggac 120
 cctgccattc cggaggaggt gtggaatatac aaacaaatga ttaagttgac acaggaacat 180
 atagaggccc tattggacaa atttggtggg gagcataatc caccatcaat atatctggag 240
 gcctatgaag aatacaccag caagctagat gcaactcaac aaagagaaca acagttattg 300
 gaatctctgg ggaacggaac tgatTTTTCT gtttctagct ctgcatcaat ggataccggt 360
 acatcttctt cctcttctag cctttcagtg ctaccttcat ctctttcagt ttttcaaaat 420
 cccacagatg tggcacggag caacccaag tcaccacaaa aacctatcgt tagagtcttc 480
 ctgccaaca aacagaggac agtggtagct gcaaggtgtg gagttacagt ccgagacagt 540
 ctaaagaaaag cactgatgat gagaggtcta atccagagt gctgtgctgt ttacagaatt 600
 caggatggag agaagaaacc aattggttgg gacactgata tttcctggct tactggagaa 660
 gaattgcatg tggaaagtgt ggagaatgtt ccacttaca cacacaactt tgtagcaaaa 720
 acgtttttca ccttagcatt ttgtgacttt tgtcgaaagc tgcttttcca gggtttccgc 780
 tgtcaaacat gtggttataa atttcaccag cgtttagta cagaagtcc actgatgtgt 840
 gtaattatg accaacttga tttgctgttt gtctccaagt tctttgaaca ccaccaata 900
 ccacaggaag aggcgtcctt agcagagact gccctaacat ctggatcatc cccttccgca 960
 cccgcctcgg actctattgg gcccacaatt ctaccagtc cgtctccttc aaaatccatt 1020
 ccaattccac agcccttccg accagcagat gaagatcatc gaaatcaatt tgggcaacga 1080
 gaccgatcct catcagctcc caatgtgcat ataaacaca tagaacctgt caatattgat 1140
 gacttgatta gagaccaagg atttcgtggt gatggaggat caaccacagg tttgtctgct 1200
 accccccctg cctcattacc tggctcacta actaacgtga aagccttaca gaaatctcca 1260
 ggacctcagc gagaaaggaa gtcacttca tcctcagaag acaggaatcg aatgaaaaca 1320
 cttggtagac gggactcgag tgatgattgg gagattcctg atgggcagat tacagtggga 1380
 caaagaattg gatctggatc atttggaaca gtctacaagg gaaagtggca tggatgatgtg 1440
 gcagtgaaaa tgttgaatgt gacagcacct acacctcagc agttacaagc cttcaaaaat 1500

gaagtaggag tactcaggaa aacacgacat gtgaatatcc tactcttcat gggctattcc 1560
 acaaagccac aactggctat tgttaccag tgggtgagg gctccagctt gtatcaccat 1620
 ctccatatca ttgagaccaa atttgagatg atcaaactta tagatattgc acgacagact 1680
 gcacagggca tggattactt acacgccaag tcaatcatcc acagagacct caagagtaat 1740
 aatatatttc ttcatgaaga cctcacagta aaaatagggtg attttgggtct agctacagag 1800
 aaatctcgat ggagtgggtc ccatcagttt gaacagttgt ctggatccat tttgtggatg 1860
 gcaccagaag tcatcagaat gcaagataaa aatccataca gctttcagtc agatgtatat 1920
 gcatttgaa ttgttctgta tgaattgatg actggacagt taccttattc aaacatcaac 1980
 aacagggacc agataatttt tatgggtggga cgaggatacc tgtctccaga tctcagtaag 2040
 gtacggagta actgtccaaa agccatgaag agattaatgg cagagtgctt caaaaagaaa 2100
 agagatgaga gaccactctt tccccaaatt ctgcctcta ttgagctgct ggcccgtca 2160
 ttgccaaaaa ttcaccgcag tgcacagaa ccctccttga atcgggctgg tttccaaaca 2220
 gaggatttta gtctatatgc ttgtgcttct ccaaaaacac ccatccaggc agggggatat 2280
 ggtgcgtttc ctgtccactg a 2301

<210> 20
 <211> 766
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20
 Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 20 25 30
 Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp
 35 40 45
 Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu
 50 55 60
 Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu
 65 70 75 80
 Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu
 85 90 95
 Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu
 115 120 125

Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val
 130 135 140
 Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe
 145 150 155 160
 Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr
 165 170 175
 Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro
 180 185 190
 Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile
 195 200 205
 Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val
 210 215 220
 Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys
 225 230 235 240
 Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe
 245 250 255
 Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys
 260 265 270
 Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu
 275 280 285
 Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu
 290 295 300
 Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala
 305 310 315 320
 Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro
 325 330 335
 Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp
 340 345 350
 His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn
 355 360 365
 Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg
 370 375 380
 Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala
 385 390 395 400

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

Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala
 675 680 685
 Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg
 690 695 700
 Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser
 705 710 715
 Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala
 725 730 735
 Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys
 740 745 750
 Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
 755 760 765

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de predicción de si un tumor será insensible al tratamiento con un anticuerpo frente a EGFr, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de B-raf V600E en una muestra de dicho tumor; en el que la presencia de la mutación de B-raf indica que el tumor será insensible al tratamiento con el anticuerpo frente a EGFr.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en una muestra de dicho tumor, en el que la mutación de K-ras se selecciona de G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A y G13D; en el que la presencia de la mutación de K-ras indica que el tumor será insensible al tratamiento con el anticuerpo frente a EGFr.
- 15 3. Método de predicción de si un paciente será insensible al tratamiento con un anticuerpo frente a EGFr, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de B-raf V600E en una muestra de tumor de dicho paciente; en el que la presencia de la mutación de B-raf indica que el paciente será insensible al tratamiento con el anticuerpo frente a EGFr.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, que comprende además determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en una muestra de tumor de dicho paciente, en el que la mutación de K-ras se selecciona de G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A y G13D; en el que la presencia de la mutación de K-ras indica que el paciente será insensible al tratamiento con el anticuerpo frente a EGFr.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, 2, 3 ó 4, en el que el anticuerpo frente a EGFr es panitumumab.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que tumor es un tumor de colon o rectal.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el tumor se obtiene de un paciente que padece cáncer de colon metastásico.
- 30 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la determinación de la presencia o ausencia de la mutación de B-raf y/o K-ras en un tumor o en una muestra de dicho tumor comprende amplificar un ácido nucleico de B-raf y/o K-ras a partir del tumor o la muestra de dicho tumor y secuenciar el ácido nucleico amplificado.
- 35 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la determinación de la presencia o ausencia de la mutación de B-raf y/o K-ras en un tumor o en una muestra de dicho tumor comprende detectar un polipéptido de B-raf y/o K-ras mutante en una muestra del tumor usando un agente de unión específica a un polipéptido de B-raf y/o K-ras mutante.

Figura 1

**Mutaciones de K-ras y B-raf en
mCRC tratado con panitumumab**

	Mejor respuesta		Total
	EP+EE	RP	
Mut +	15	1	16
Mut -	6	3	9
Total	21	4	25

Figura 2A

(SEQ ID NO: 1) ADNc de K-ras de tipo natural

ATGACTGAAT ATAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGGC TAGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGANGCAG TAGTAAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAATAATAC TAATCATT GAAGATATC 280
 ACCATTATAG AGAACAAAT AAAAGATTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAATPAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAATTA TGGAAATCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGAAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAACAACTAA AGAAAGATG AGCAAGATG GTAAAAGAA GAAAAGAGAG TCARAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

(SEQ ID NO: 2) Secuencia de aminoácidos de K-ras de tipo natural

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YNRTGEGFLC VFAINNPKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKREKM SKDGKSKKKK SNTKCVIM 188

Figura 2B

(SEQ ID NO: 3) ADNc de K-ras (G12S)

ATGACTGAAT ATAACTTGT GGTAGTTGGA GCTAGTGGCG TAGGCANGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGNATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTTAC AGGRAGCCAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAACCC TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCRAAT GAGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTGGCCA TAAATAATAC TAAATCAATT GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGAACAAATT AAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCCTAG TAGGAATAA 350
 ATGTGTTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAGTTA TGGNATTCCT 420
 TTTATTGAA CATCAGCAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGGAAATTC 490
 GAAACATAA AGAAAGATG ACCAAGATG GTAAAGAA GAAAGAGAG TCAAGACAA AGTGTGTAA 560
 TATGTAA 567

(SEQ ID NO: 4) Secuencia de aminoácidos de K-ras (G12S)

MTEYKLVVVG ASGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSANRDQ YMRITGEGFLC VFAINNKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDFV FVLYGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKRKM SKDGKRRKKK SKTKCVIN 188

Figura 2C

(SEQ ID NO: 5) ADNc de K-ras (G12V)

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGTTGGCG TAGGCAACGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACRATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGRCACG 210
 TACATCAGGA CTGGGGGAGG CTTTCTTGT GTATTGGCCA TAATAATAC TAATCATTT GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGAACAAAT AAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGFACT ATGGTCTTAG TAGGAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAACATAA AGAARAGATG AGCAAGATG GTAAAAGAA GAAAAGACAG TCARAGACAA AGTGTGTAAT 567
 TATGTAA 567

(SEQ ID NO: 6) Secuencia de aminoácidos de K-ras (G12V)

MTEYKLVVVG AVGVKSAIT IQLIQLNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDYTAG QEYSAMRDQ YNRTGEGELC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTRQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKERM SKDGKTKKKK SKTKCVIM 188

Figura 2D

(SEQ ID NO: 7) ADNc de K-ras (G12D)

ATGACTGAAT ATAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGATGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGNATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACNATAGA GGATTCCTAC AGGARCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGACCCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAATAATAC TAATCATTT GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGRACAAAT AANAAGTTA AGGACTCTGA AGATGACCT ATGCTCCTAG TAGGAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AANACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGNATTOCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAARACATTA AGAANAAGATG ASCAAGATG GTANAAGNA GAAAAGAGT TCAAGACAA AGTGTGTAA 560
 TATGTAA 567

(SEQ ID NO: 8) Secuencia de aminoácidos de K-ras (G12D)

MTEYKLVVVG ADGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRITGEGFLC VFAINNTKSF EDIHNYREQI 100
 KRVKDSEDFP MVLVGNKCDL PSRTVDTKOA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKEM SKDGKTKKK SKTKCVIM 188

Figura 2E

(SEQ ID NO: 9) ADNc de K-ras (G12A)

ATGACTGAAT ATAACTTGT GGTAGTTGA GCTGCTGGG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAT GAGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTGT GTATTTCCCA TAAATATAC TAAATCATT GAAGATATC 280
 ACCATTATAG AGAACAAAT AAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACTT ATGGTCTTAG TAGGAATAA 350
 ATGTGATTG CCTTCTAGAA CAGTAGACRC AANACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAGTTA TGGAAATCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTCTA TACATTAGT CGAGAAATC 490
 GAAACATAA AGAAAGATG ACCAAGATG GTAAAGAA GAAAGAGAG TCAANGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTRA 567

(SEQ ID NO: 10) Secuencia de aminoácidos de K-ras (G12A)

MTEYKLVVVG ARGVGSALT IQLIONHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEYSAMRDQ YMRTEGFLC VFAINTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEVPE MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKERM SKDGKTKKKK SKTKCVIM 188

Figura 2F

(SEQ ID NO: 11) ADNc de K-ras (G12C)

ATGACTGAAT ATAACTTGT GGTAGTTGGA GCTTGTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAT GAGGGACCCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGG CTTTCTTGT GTATTTGCCA TAATAATAC TAATCATTT GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGAACAAAT AAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCTTAG TAGGAAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGRA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTC 420
 TTTATTGAAA CATCAGCMAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAAACATAA AGAAAGATG AGCAANGATG GTRAAAAGAA GAAAAGAAG TCAAGACCAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

(SEQ ID NO: 12) Secuencia de aminoácidos de K-ras (G12C)

MTEYKLVVVG ACGVKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQWIDGET 50
 CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YNRTGEGFLC VFAINNPKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDVP MVLVGNKCDL PSRFVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKERM SKDGKSKKKK SKTKCVIM 188

Figura 2G

(SEQ ID NO: 13) ADNc de K-ras (G13A)

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGCCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATTCCTGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATTI GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGRACAATTT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCTCTAG TAGGAANTAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGCCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAAGCAG GGTGTTGATG ATGCCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAACATATA AGRAAAGATG AGCAAGATG GTAAAAGAA GAAAAGAGAG TCAAAGACAA AGTCTGTAT 560
 TATGTAA 567

(SEQ ID NO: 14) Secuencia de aminoácidos de K-ras (G13A)

MTEYKLVVVG AGAVGKSAIT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEYSAMRDQ YMRTEGEGFLC VFAINTRKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEIVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKERM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188

Figura 2H

(SEQ ID NO: 15) ADNc de K-ras (G13D)

ATGACTGAAT ATRAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGCTGACG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAT GAGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTGCGA TAAATAATAC TAATCAATT GAAGATATC 280
 ACCATTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGTCCTAG TAGGAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTCTA TACATTAGTT CGAGAATTC 490
 GAAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAGATG GTRAAAAGAA GAAAAGAAG TCAAGACAAA AGTGTGTAAT 560
 TAGTAA 567

(SEQ ID NO: 16) Secuencia de aminoácidos de K-ras (G13D)

MTEYKLVVVG AGDVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEYSAMRDQ YMRTEGELC VFAINNTKSF EDIHYYREQI 100
 KRVKDSEUVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKTKKKK SKTKCVIM 188

Figura 3B

(SEQ ID NO: 18) Secuencia de aminoácidos de b-RAF de tipo natural

MAALSGGGGGAEFGQALFNGDMEPEAGAGAGAAASSAADPAIPEEVVNI
 KQMIKLTQEHIEALLDKFEGEHNPPSIYEAIEYTSKLDALQQREQQLL
 ESLNGTDFSVSSASMDVTSSSSSSLSVLPSSLSVFQNFPTDVARSNPK
 SPQKPIVRVFLPNKORTVVPARGVTVRDLSKKALMMRGLIPECCAVYRI
 QDGEKKPIGWDIDI SMLTGEELHVEVLENVPLTHNFVRKTFFTLAFCDF
 CRKLLFQGRFQTCGYKFKHQRCSFVPLMCVNYDQLDLLFVSKFEHHPI
 PQEASLAETALTSGSSPSAPASDSIGPQILLTSPSPSKSIPIQPFRPAD
 EDHRNQFGDRSSAPNVHINTIEPVNIDDLIRDQGRGDDGGSTGLSA
 TTPASLPGSLTNVKALQKSPGQORERKSSSSEDRNRMKT LGRDSSDDW
 EIPDQIITVGRIGSGSFGTVYKGNHGDVAVKMLNVTAPTPOQLQAFKN
 EVGLRKRTRHVNI LLFMGYSTKPOLAVTQWCEGSSLYHHLHI IETKFEM
 IKLIDIAEQTAQMDYLHAKSIIHRDLKSNNI FLHEDLTVKIGDFGLATV
 KSRWSSGHQFEQLSGSILWMAPEVIRMQDKNPYSEFQSDVYAFGIVLYELM
 TGQLPYSNINNRDQII FVVGRTLSFDLSKVRSNCFKAMKRLMAECLKKK
 RDERPLFPQILASIELLARSLPKIHRSASEPSLNRAGFQTEDFSLYACAS
 PKTPIQAGGYGAFPVH

Figura 3D

(SEQ ID NO: 20) Secuencia de aminoácidos de b-RAF (V600E)

MAALSGGGGGAFFQALFNGDMEPEAGAGAGAASAADPAIPEEVWNI
 KQMIKLTQEHIEALLDKFGGEHNPPSIYLEAYEYTSKLDALQQRQQLL
 ESLNGTDFSVSSASMDVTSSSSLSVLPSSLSVFQNFPTDVARSNPK
 SPOKPIVRVFLPNKQRTVVPARGVTVRDSLKKALMMRGLIPECCAVYRI
 QDGEKKPIGWDTDISWLTGEELHVEVLENVPLTTHNFVTKTFFTLAFCDF
 CRKLLFQGFRCQTCGYKFORCSTEVPMLCVNYDQLDLLFVSKFFEHPI
 PQEASLAETALTSGSSPSAPASDSIGFQILLTSPFSKSIPIQPFPPAD
 EDHRNOFGORDRSSAPNVHINTIEPVNIDDLIRDOGFRGDGGSTIGLSA
 TFPASLPGSLTNVKALQKSPGQPERKSSSSEDRNPKTLGRRDSSDDW
 EIFDQITVQQRIGSGSFGTVYKKGWHDVAVKMLNVTAPTQQLOAFKN
 EVGVLRKTRHVNILLFMGYSTKPOLAIVTQWCEGSSLYHHLHIETKFM
 IKLIDLARQTAQGM DYLHAKSIIHRDLKSNIFLHEDLTVKIGDFGLATE
 KSRWSGSHQFEQLSGSILMMAPEVIRMQDKNPYSFQSDVYAFGIVLYELM
 TGQLPYSNINNRDQIIFMVGRGYLSPDLSKVRSNCPKAMKRLMAECLKKK
 RDERPLFPQILASIELLARS LPKIHRSASEPSLNRAGFQTEDFSLEYACAS
 PKTFIQAGGYGAFVH