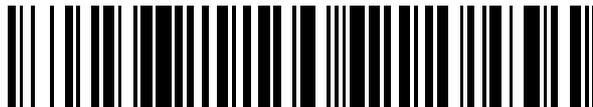


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 626**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2008 E 08742061 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2121989**

54 Título: **Mutaciones en K-ras y terapia con anticuerpos anti-EGFr**

30 Prioridad:

13.03.2007 US 906943 P

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

06.05.2014

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**FREEMAN, DANIEL;
JUAN, TODD y
RADINSKY, ROBERT**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 458 626 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutaciones en K-ras y terapia con anticuerpos anti-EGFr5 **CAMPO**

La presente solicitud se refiere a las mutaciones de K-ras, a polinucleótidos que codifican polipéptidos mutantes de K-ras, y a métodos de identificación de las mutaciones de K-ras. La presente solicitud también se refiere a métodos para el diagnóstico del cáncer; y métodos y kits para la predicción de la utilidad de los agentes de unión específicos anti-EGFR en el tratamiento de tumores.

Antecedentes

15 Ciertas aplicaciones de anticuerpos monoclonales en la terapia del cáncer se basan en la capacidad del anticuerpo para liberar específicamente a los tejidos cancerosos funciones efectoras citotóxicas tales como isotipos, toxinas o fármacos que mejoran el sistema inmunitario. Un enfoque alternativo es utilizar anticuerpos monoclonales para afectar directamente a la supervivencia de las células tumorales, privándolas de señales de proliferación extracelulares esenciales, tales como aquellas mediadas por factores de crecimiento a través de sus receptores celulares. Uno de los objetivos atractivos en este enfoque es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se une a EGF y al factor de crecimiento transformante α (TGF α) (véanse, p. ej., 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, Philadelphia: 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 de superficie celular transmembrana de 170 kDa, desencadena una cascada de eventos bioquímicos celulares, incluyendo la autofosforilación y la internalización EGFr, que culmina en la proliferación celular (véase, por ejemplo, Ullrich et al., Cell 61:203-212, 1990).

20 Varias observaciones implican a EGFr en el apoyo al desarrollo y la progresión de tumores sólidos humanos. Se ha demostrado que el EGFr se expresa en exceso 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 Intl J. Oncología 4:277-296 (1994)). Por ejemplo, la expresión en exceso de EGFr se ha observado en algunos carcinomas de pulmón, de mama, de colon, gástricos, de cerebro, de vejiga, de cabeza y cuello, de ovario, y de próstata (véase, por ejemplo, Modjtahedi y Dean Intl J. Oncology 4:277-296 (1994)). Se ha informado que el aumento en los niveles de receptor está asociado con un mal pronóstico clínico (véase, p. ej., Baselga et al. Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn et al., Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Philadelphia: 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 factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) se unen a EGF-r y conducen a la proliferación celular y el crecimiento tumoral. En muchos casos, el aumento de la expresión de EGFr en superficie fue acompañado por la producción de TGF α o EGF por las células tumorales, lo que sugiere la participación de un control de crecimiento autocrino en la progresión de los tumores (véanse, p. ej., Baselga et al. Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn et al., Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Philadelphia: JB 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 De este modo, ciertos grupos han propuesto que los anticuerpos contra EGF, TGF- α , y EGF-r pueden ser útiles en la terapia de tumores que expresan o expresan en exceso EGF-R (véanse, p. ej., Mendelsohn Cancer Cells 7:359 (1989), Mendelsohn Cancer Biology 1:339-344 (1990), Modjtahedi y Dean Intl J. Oncology 4:277-296 (1994), Tosi et al. Intl J. Cancer 62:643-650 (1995)). De hecho, se ha demostrado que los anticuerpos anti-EGF-R que bloquean la unión de EGF y de TGF- α al receptor parecen inhibir la proliferación de células tumorales. Al mismo tiempo, sin embargo, no parece que los anticuerpos anti-EGF-R inhiban el crecimiento celular independiente de EGF y TGF- α (Modjtahedi y Dean Intl J. Oncology 4:277-296 (1994)).

Los anticuerpos monoclonales específicos para EGFr humano, capaces de neutralizar la unión de EGF y TGF α a las células tumorales y de inhibir la proliferación celular mediada por ligandos in vitro, han sido generados a partir de ratones y ratas (véanse, p. ej., Baselga et al., Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn et al., Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Philadelphia: 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 esos anticuerpos, tales como el 108, el 225 (véase, p. ej., Aboud-Pirak et al., J. Natl. Cancer Inst. 80: 1605-1611, 1988) y el 528 (véanse, p. ej., Baselga et al., Pharmacol. Ther. 64: 127-154, 1994; Mendelsohn et al., en Biologic Therapy of Cancer págs. 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott Co, 1995) de ratón o los anticuerpos monoclonales ICR16, ICR62 y ICR64 de rata (véase, p. ej., Modjtahedi et al., Intl. J. Oncology 4: 277-296, 1994; Modjtahedi et al., Fr. J. Cancer 67:247-253, 1993; Modjtahedi et al., Fr. J. Cancer 67: 254-261, 1993), se evaluaron exhaustivamente para determinar su capacidad para afectar al crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de ratón. La mayoría de los anticuerpos monoclonales anti-EGFr fueron 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., Fr. J. Cancer

67: 254-261, 1993). Cuando se inyectaron a ratones portadores de xenoinjertos de tumores humanos establecidos, los anticuerpos monoclonales de ratón 225 y 528 causaron la regresión parcial del tumor y requirieron la administración simultánea de agentes quimioterapéuticos, 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, Philadelphia: 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 de los anticuerpos de ratón se conectan a regiones constantes humanas, exhibió una actividad antitumoral *in vivo* mejorada, pero sólo a dosis elevadas (véase, p. ej., Goldstein et al., *Clinical Cancer Res.* 1: 1311-1318, 1995; Prewett et al., *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 19: 419-427, 1996). Los anticuerpos ICR16, ICR62 e ICR64 de rata causaron la regresión de tumores establecidos, pero no su erradicación completa (Modjtahedi et al., *Fr. J. Cancer* 67: 254-261, 1993). Estos resultados establecieron EGFr como una diana prometidora para la 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 (véase, p. ej., Baselga et al. *Pharmacol. Ther.* 64: 127-154, 1994; Mendelsohn et al., *Biologic Therapy of Cancer* págs. 607-623, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1995; Modjtahedi et al., *Intl. J. of Oncology* 4:277-296, 1994).

Ciertos avances en las técnicas biológicas hacen posible la producción de un anticuerpo anti-EGFR completamente humano. Utilizando ratones transgénicos para genes de inmunoglobulina humanos (tecnología XenoMouse™, Abgenix, Inc.), se desarrollaron anticuerpos humanos específicos para EGFR humanos (véanse, p. ej., Méndez, *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 WO98/24893; documento WO 98/50433). Se ha demostrado que uno de tales anticuerpos, el panitumumab, un anticuerpo monoclonal IgG2 humano con una afinidad de 5×10^{11} M por el EGFr humano, bloquea la unión de EGF a EGFr, bloqueando la señalización del receptor, e inhibiendo la activación de las células del tumor y la proliferación *in vitro* (véase, p. ej., el documento WO98/50433; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.235.883). Los estudios en ratones atímicos han demostrado que el panitumumab también tiene actividad *in vivo*, no sólo previniendo de la formación de xenoinjertos A431 de carcinoma epidermoide humano en ratones atímicos, sino también la erradicación de grandes xenoinjertos tumorales A431 ya establecidos (véanse, p. ej., Yang et al., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38(1):17-23, 2001; Yang et al., *Cancer Res.* 59(6):1236-43, 1999). El panitumumab ha sido considerado para el tratamiento del carcinoma renal, el adenocarcinoma colorrectal, el cáncer de próstata, y el carcinoma de pulmón escamoso de células no pequeñas, entre otros tipos de cáncer (véase, p. ej., la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0033543), y están en marcha ensayos clínicos con ese anticuerpo. El Panitumumab ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

La activación del EGFR desencadena al menos dos vías de señalización. En ciertos tipos de células, la activación del EGFR previene la apoptosis mediante la estimulación de la fosfatidilinositol 3-quinasa ("PI3K"). La activación de PI3K desencadena una cascada molecular que conduce a la regulación a la baja de las vías centrales que controlan la muerte celular programada (Yao, R., *Science* 267:2003-2006, 1995). En ciertos tipos de células, la activación del EGFr inicia la cascada de MAPK a través de Ras/Raf.

Eberhard et al. (*Journal of Clinical Oncology* 2005, vol. 23(25), págs. 5900-5908) informan de que las mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras se asocian con una disminución significativa del tiempo de progresión y supervivencia en pacientes que sufren de cáncer de pulmón de células no pequeñas y que reciben el inhibidor de quinasa EGFr de molécula pequeña erlotinib en combinación con quimioterapia, en comparación con los pacientes que reciben solo quimioterapia.

Pao et al. (*Plos Medicine* 2005, vol. 2 (1), págs. 0057-0061) informan de la mala respuesta de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón que portan determinadas mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras después del tratamiento con los inhibidores de quinasa de EGFR de molécula pequeña erlotinib o gefitinib.

Lièvre et al. (*Cancer Research* 2006, vol. 66, págs. 3992-3995) ilustran que los pacientes con cáncer colorrectal que portan determinadas mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras responderán bien al tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR cetuximab.

El documento WO2007/001868 reivindica un procedimiento para identificar un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de EGFR, p. ej., panitumumab, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras y un EGFR, por medio de lo cual la presencia tanto de una mutación de K-ras como de un EGFR indica un paciente que no responderá a dicho tratamiento inhibidor.

Compendio

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

En una realización, se proporciona un método de predecir si un paciente que sufre de cáncer colorrectal no responderá al tratamiento con panitumumab, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en un tumor de dicho paciente, en donde la mutación de K-ras se selecciona entre G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, y G13D; y en donde si está presente una mutación de K-ras, se prevé que el paciente no responderá al tratamiento con panitumumab.

En otra realización, se proporciona un método para predecir si un tumor de cáncer colorrectal no responderá al tratamiento con panitumumab, que comprende determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en una muestra de dicho tumor, en donde la mutación de K-ras se selecciona entre G12S, G12V, G12D, G12A, G12C y G13D; y en donde la presencia de la mutación de K-ras indica que el tumor no responderá al tratamiento con panitumumab,

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A a 1I muestran las secuencias de ADNc y de aminoácidos de K-ras de tipo salvaje (SEQ ID NOS: 1 y 2), el mutante G12S de K-ras (SEQ ID NOS: 3 y 4), el mutante G12V de K-ras (SEC ID NO: 5 y 6), el mutante G12D de K-ras (SEQ ID NO: 7 y 8), el mutante G12A de K-ras (SEQ ID NO: 9 y 10), el mutante G12C de K-ras (SEQ ID NO: 11 y 12), el mutante G13A de K-ras (SEQ ID NO: 13 y 14), el mutante G13D de K-ras (SEQ ID NO: 15 y 16), y el mutante T20M de K-ras (SEQ ID NO: 17 y 18).

Descripción detallada de ciertas realizaciones

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos normales en la técnica. Adicionalmente, a menos que sea requerido por el contexto, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular.

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, la biología molecular, y la química de proteínas y oligo- o polinucleótidos y de hibridación descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo y transformación de tejidos (p. ej., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se completan comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y comentan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, p. ej., Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritos en la presente memoria son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales de síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y liberación, y el tratamiento de pacientes.

En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. En el contexto de una reivindicación dependiente múltiple, el uso de "o" se refiere de nuevo a más de una de las reivindicaciones precedentes independientes o dependientes en la alternativa solamente. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Tal como se utiliza de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

Los términos "polinucleótido aislado" y "ácido nucleico aislado" se utilizan indistintamente, y según se utiliza en la presente memoria significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen (1) no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está conectado operablemente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

Los términos "proteína aislada" y "polipéptido aislado" se utilizan indistintamente, y según se refiere en la presente memoria significa una proteína de ADNc, ARN recombinante, o de origen sintético, o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, (1) no está asociada con proteínas que se encuentran en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo libre de proteínas murinas, (3) es

expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no aparece en la naturaleza.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y se utilizan en la presente memoria como un término genérico para referirse a la proteína nativa, fragmentos, péptidos, o análogos de una secuencia polipeptídica. Por lo tanto, proteína nativa, fragmentos, y análogos son especies del género polipéptido.

La terminología "X#Y" en el contexto de una mutación en una secuencia de polipéptido es reconocida en la técnica, en donde "#" indica la ubicación de la mutación en términos del número de aminoácidos del polipéptido, "X" indica el aminoácido encontrado en esa posición en la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje, 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 salvaje, y que la glicina se reemplaza por una serina en la secuencia de K-ras mutante.

Los términos "polipéptido de K-ras mutante" y "proteína de K-ras mutante" se utilizan indistintamente, y se refieren a un polipéptido de K-ras que comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada entre G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A, G13D, y T20M. Ciertos polipéptidos de K-ras mutantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas, variantes de empalme, variantes derivadas, variantes de sustitución, variantes de delección, y/o variantes de inserción, polipéptidos de fusión, ortólogos, y homólogos interespecíficos. En ciertas realizaciones, un polipéptido de K-ras mutante incluye residuos adicionales en el extremo C- o N-terminal, tales como, pero no limitados a, residuos de la secuencia líder, residuos selectivos, los residuos de metionina amino terminales, residuos de lisina, residuos de etiquetas y/o residuos de proteínas de fusión.

El término "de origen natural" según se utiliza en la presente memoria aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionadamente por el hombre en el laboratorio o de otro modo es de origen natural.

El término "conectado operativamente" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la colocación de los componentes de tal manera que estén en una relación que les permita funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de control "conectada operativamente" a una secuencia codificante está conectada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término "secuencia de control" según se utiliza en la presente memoria, 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 anfitrión; en procariontes, tales secuencias de control generalmente incluyen el promotor, el sitio de unión al ribosoma, y las secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotes, generalmente, tales secuencias de control incluyen los promotores y las secuencias de terminación de la transcripción. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañeros de fusión.

El término "polinucleótido" referido en la presente memoria significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye las formas de ADN de cadena sencilla y doble.

El término "oligonucleótido" referido en la presente memoria incluye nucleótidos de origen natural y modificados unidos entre sí por medio de enlaces oligonucleotídicos de origen natural, y de origen no 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 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son normalmente de cadena sencilla, p. ej., para las sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo para su uso en la construcción de un mutante del gen. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos efectores o antisentido.

Los términos " polinucleótido de K-ras mutante ", "oligonucleótido de K-ras mutante", y "ácido nucleico de K-ras mutante" se utilizan indistintamente, y se refieren a un polinucleótido que codifica un polipéptido de K-ras que comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada entre G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A, G13D, y T20M.

El término "nucleótidos de origen natural" referido en la presente memoria incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" referido en la presente memoria incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" mencionado en este documento incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforoaniladato, fosforoamidato, y similares. Véase, p. ej., 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 de los Estados Unidos Núm. 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una marca para su detección, si se desea.

El término "hibrida selectivamente" referido en la presente memoria significa que se une detectable y específicamente. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos hibridan selectivamente con cadenas de ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Se pueden utilizar condiciones de alta rigurosidad para las lograr condiciones de hibridación selectivas conocidas en la técnica y comentadas en la presente memoria. Generalmente, la homología de secuencia del ácido nucleico de entre los polinucleótidos, oligonucleótidos, y fragmentos y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos 80%, y más típicamente con homologías preferiblemente crecientes de al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología de 85% significa que 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para el máximo emparejamiento. Se permiten espacios (en cualquiera de las dos secuencias que se están emparejando) en el emparejamiento máximo; se prefieren longitudes de los espacios de 5 o menos siendo más preferido 2 o menos. Alternativamente y preferiblemente, dos secuencias de proteínas (o secuencias de polipéptidos derivadas de ellas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, según se utiliza este término en la presente memoria, si tienen una puntuación de alineamiento de más de 5 (en unidades de desviación típica) utilizando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por espacio de 6 o mayor. Véase Dayhoff, M.O., en el Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y Suplemento 2 de ese volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos tienen una identidad mayor o igual a 50% cuando se alinean óptimamente utilizando el programa ALIGN. El término "corresponde a" se utiliza en la presente memoria para significar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) a toda o una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia. En contraposición, el término "complementario a" se utiliza en la presente memoria para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia. A título ilustrativo, 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 utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: "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 utilizada 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 un ADNc o secuencia génica completos proporcionados en una lista de secuencias o puede comprender una secuencia de ADNc o génica completa. En general, 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 cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción del polinucleótido o secuencia de aminoácidos completos) que es similar entre las dos moléculas, y (2) pueden comprender adicionalmente una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se realizan típicamente comparando secuencias de las dos moléculas a través de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos en donde una secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos se pueden comparar con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o secuencias de 6 aminoácidos y en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, deleciones, sustituciones y similares (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), paquetes de soporte lógico de Geneworks o MacVector), o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generado por los diversos métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, sobre una base de 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 óptimamente alineadas a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparecen la base o residuo de ácido nucleico idénticos (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" según se utiliza en la presente memoria denota una característica de una secuencia de polinucleótidos o de aminoácidos, en donde el ácido polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más usualmente al menos 96, 97, 98, o 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 nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que suman 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.

Según se utiliza en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2^a edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a L aminoácidos de origen natural o a D aminoácidos. En la presente memoria se utilizan las abreviaturas de una y tres letras comúnmente utilizadas para los aminoácidos (Bruce Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., Nueva York (4^a ed. 2002)). Los estereoisómeros (p. ej., 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 también pueden ser componentes adecuados para los 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-fosfoferina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos utilizada en la presente memoria, la dirección izquierda es la dirección amino terminal y la dirección derecha es la dirección carboxi terminal, de acuerdo con el uso y la convención normalizados.

De un modo similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos de cadena sencilla es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias polinucleotídicas bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de 5' a 3' de los transcritos de ARN naciente se denomina dirección de transcripción. Las regiones de la secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias aguas arriba". Las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias aguas abajo".

Según se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando los pesos de los espacios por defecto, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95, 96, 97, o 98 por ciento de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Según se comenta en la presente memoria se discute aquí, se contempla que variaciones mínimas en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina están abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, 90%, 95%, y lo más preferiblemente 99%. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas 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) alcalinos = lisina, arginina, histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga = glicina, asparragina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Las familias más preferidas son: serina y treonina son de la familia hidroxialifática; asparragina 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 son una familia de cadena lateral que contiene azufre. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre la unión o propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro de un sitio marco. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido glutámico-ácido aspártico, cisteína-metionina, y asparagina-glutamina.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (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 de origen natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia de origen natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del dominio o los dominios que forman contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (p. ej., una sustitución de aminoácido de no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia parental). Los ejemplos de las estructuras secundarias y terciarias polipeptídicas reconocidas en la técnica se describen en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

El término "análogo" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a polipéptidos que se componen de un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene una identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de origen natural y que tiene al menos una de las actividades de el polipéptido de origen natural. Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución de aminoácido conservativa (o adición o delección) con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos típicamente tienen al menos 20 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 50 aminoácidos de longitud o más, y a menudo pueden ser tan largos como toda la longitud del polipéptido de origen natural.

Los análogos peptídicos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); and Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular informatizado. Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles se pueden utilizar para producir un efecto terapéutico o profiláctico 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 reemplazados opcionalmente por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, mediante métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (p. ej., D-lisina en lugar de L-lisina) se puede utilizar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de la secuencia consenso sustancialmente idéntica se pueden generar por medio de métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992); por ejemplo, mediante la adición de residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido).

Los extremos amino- y carboxi- terminales preferidos de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar por comparación de datos de las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferiblemente, se utilizan métodos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencias o dominios de conformación de proteína pronosticada que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Los métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan a una estructura tridimensional conocida son conocidos (véase Bowie et al. Science 253:164 (1991)). Los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencias y conformaciones estructurales que se pueden utilizar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

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 los agentes de unión específica incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, y compuestos de moléculas pequeñas. En ciertas realizaciones, un agente de unión específica es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un agente de unión específica es una región de unión al antígeno.

El término "agente de unión específica a un polipéptido de EGFR" se refiere a un agente de unión específica que se une específicamente cualquier porción de un polipéptido de EGFR. En ciertas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de EGFR es un anticuerpo para un polipéptido de EGFR. En ciertas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de EGFR es una región de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de EGFR es un anticuerpo de EGFR. En ciertas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de EGFR es el panitumumab.

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 porción de un polipéptido de K-ras mutante. En ciertas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de K-ras mutante es un anticuerpo para un polipéptido de K-ras mutante.

En ciertas realizaciones, un agente de unión específica a un polipéptido de K-ras mutante es una región de unión a antígeno.

El término "se une específicamente" se refiere a la capacidad de un agente de unión específica para unirse a una diana con una afinidad mayor que aquella con la que se une a una no diana. En ciertas realizaciones, la unión específica se refiere a la unión a una diana con una afinidad que es al menos 10, 50, 100, 250, 500, o 1000 veces mayor que la afinidad para una no diana. En ciertas realizaciones, la afinidad se determina mediante un ensayo ELISA de afinidad. En ciertas realizaciones, la afinidad se determina mediante un ensayo BIAcore. En ciertas realizaciones, la afinidad se determina por medio de un método cinético. En ciertas realizaciones, la afinidad se determina por medio de un método de equilibrio/disolución. En ciertas 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 epítopos reconocidos es ≤ 1 M, preferiblemente ≤ 100 nM y lo más preferiblemente ≤ 10 nM.

Los "anticuerpos nativos y las inmunoglobulinas", en ciertos casos, son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas (H) pesadas 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 también presenta puentes disulfuro intracatenarios espaciados 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 los residuos de aminoácidos concretos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada (Chothia et al. J. Mol. Biol. 186:651 (1985); Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4592 (1985); Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)).

El término "anticuerpo" se refiere tanto a 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 porción o fragmento de una molécula de anticuerpo intacta, en donde el fragmento conserva la función de unión al antígeno. Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos, tal como mediante escisión con papaína. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla ("scFv"), fragmentos Fd' y Fd. Los métodos para producir los diversos fragmentos a partir de anticuerpos monoclonales son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Pluckthun, 1992, Immunol. Rev. 130:151-188). Se entiende que un anticuerpo que no sea un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene idénticos cada uno de sus sitios de unión. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adherencia de un receptor a un contrarceptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contrarceptor en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, o 80%, y más usualmente más de aproximadamente 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% (como se mide en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de 95% en WT de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y la secuenciación de aminoácidos terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que no estará presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad con las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los 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, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. En una especie Fv de dos cadenas, esta región comprende un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y de la cadena ligera en estrecha asociación, no covalente. En una especie Fv de una sola cadena, un dominio variable de la pesada y de la cadena ligera puede unirse covalentemente por medio de un conector peptídico flexible de manera que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El término "región hipervariable" cuando se utiliza en la presente memoria se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (p. ej., residuos 24-34 (L1), 50-62 (L2), y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-55 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (p. ej., 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. Biol. 196:901-917 (1987)). "Región Marco" o residuos "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable como se define en la presente memoria.

El término "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR," cuando se utiliza en la presente memoria, se refiere a porciones de receptores inmunológicos que entran en contacto con un ligando específico y determinan su especificidad. Las CDR de receptores inmunológicos son la porción más variable de la proteína receptora, proporcionando a los receptores su diversidad, y son portadas en seis bucles en el extremo distal de los dominios variables del receptor, tres bucles procedentes de cada uno de los dos dominios variables del receptor.

"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 Fc (FcR) (por ejemplo, células Asesina Naturales "Natural Killer" (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias que median la ADCC, las células NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII and FcγRIII. La expresión de Fc en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.500.362, o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, p. ej., en un modelo animal tal como el descrito por Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1988).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico susceptible de unión específica a una inmunoglobulina y/o receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones de superficies químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

El término "agente" se utiliza en la presente memoria para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto elaborado de materiales biológicos.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "marca" o "marcado" se refiere a la incorporación de un marcador detectable, p. ej., mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de radicales biotínico que se puede detectar mediante avidina marcada (p. ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se pueden detectar por medio de métodos ópticos o colorimétricos). En ciertas situaciones, la marca o marcador también pueden ser terapéuticos. Varios métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas son conocidos en la técnica y se pueden utilizar. Los ejemplos de los marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotínico, y epítipos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas). En algunas realizaciones, las marcas se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

El término "agente farmacéutico o fármaco" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto

químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. Otros términos químicos en la presente memoria se utilizan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica mediante The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

5 El término "agente antineoplásico" se utiliza en la presente memoria para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o la progresión de una neoplasia 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 los agentes antineoplásicos. En ciertas realizaciones, un agente antineoplásico es el panitumumab.

15 Según se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre 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 objeto comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente 85%, 90%, 95%, 96, 97, 98, o 99%. Lo más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición por medio de métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término paciente incluye sujetos humanos y animales.

25 Los términos "mamífero" y "animal" para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, de zoológicos y de deportes, o animales de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es el ser humano.

30 El término "estado de enfermedad" se refiere a un estado fisiológico de una célula o de todo un mamífero en el que se ha producido una interrupción, suspensión, o trastorno de las funciones, sistemas u órganos celulares o corporales.

35 Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico o trastorno no deseados, tal como el desarrollo o propagación de cáncer. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, 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 aquellos que ya tienen la afección o trastorno así como los propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la afección o trastorno.

45 El término "sensible" según se utiliza en la presente memoria significa que un paciente o un tumor muestra una respuesta completa o una respuesta parcial después de la administración de un agente, de acuerdo con RECIST (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos en sus siglas inglesas). El término "no sensible" según se utiliza en la presente memoria significa que un paciente o un tumor muestra enfermedad estable o enfermedad progresiva después de la administración de un agente, de acuerdo con los criterios RECIST. RECIST es descrito, por ejemplo, por Therasse et al., Febrero de 2000, en "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors", J. Natl. Cancer Inst. 92(3): 205-216, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. Los agentes ilustrativos incluyen agentes de unión específica a un polipéptido de EGFR, incluyendo pero no limitados a, anticuerpos para EGFR.

55 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría de uno o más tratamientos. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de los trastornos que se va a tratar en la presente memoria incluyen tumores benignos y malignos, leucemias y tumores malignos linfoides, en particular, cáncer de mama, ovario, recto, estómago, endometrio, glándula salival, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o vejiga. Un trastorno preferido que se va a tratar de acuerdo con la presente invención es un tumor maligno, tal como carcinomas cervicales y neoplasia intraepitelial cervical escamosa y glandular, carcinoma de células renales (RCC), tumores de 60 esófago y líneas celulares derivadas de carcinoma.

Una "enfermedad o afección relacionada con un polipéptido de EGFR" incluye uno o más de las siguientes: una enfermedad o afección causada por un polipéptido de EGFR; una enfermedad o afección a las que contribuye un

polipéptido de EGFr; y una enfermedad o afección que se asocia con la presencia de un polipéptido de EGFr. Una enfermedad o afección relacionada con un polipéptido de EGFr pueden ser un cáncer. Los cánceres ilustrativos 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 afección relacionada con un polipéptido de K-ras mutante" incluye uno o más de las siguientes: una enfermedad o afección causada por un polipéptido de K-ras mutante; una enfermedad o afección a las que contribuye un polipéptido de K-ras mutante; una enfermedad o afección causada por un polipéptido de K-ras mutante; y una enfermedad o afección que se asocia con la presencia de un polipéptido de K-ras mutante. La enfermedad o afección relacionada con un polipéptido de K-ras mutante pueden existir en ausencia del polipéptido de K-ras mutante. La enfermedad o afección relacionada con un polipéptido de K-ras mutante se pueden exacerbar por la presencia de un polipéptido de K-ras mutante. Una enfermedad o afección relacionada con un polipéptido de K-ras mutante puede ser un cáncer. Los cánceres ilustrativos 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 la "terapia combinada", los pacientes son tratados con un agente de unión específica para un antígeno diana combinado con un agente quimioterapéutico o antineoplásico y/o terapia de radiación. En ciertas realizaciones, el agente de unión específica es el panitumumab. Los diseños de protocolo abordarán la eficacia evaluada por la reducción de la masa tumoral, así como la capacidad para reducir las dosis habituales de la quimioterapia convencional. Estas reducciones de dosificación permitirán una terapia adicional y/o prolongada reduciendo la toxicidad relacionada con la dosis del agente quimioterapéutico.

"Monoterapia" se refiere al tratamiento de un trastorno mediante la administración la inmunoterapia a pacientes sin un agente quimioterapéutico o antineoplásico acompañantes. En ciertas realizaciones, la monoterapia comprende la administración de panitumumab en la ausencia de un agente quimioterapéutico o antineoplásico y/o terapia de radiación.

Descripciones

En la presente memoria un método para diagnosticar una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto.

En la presente memoria se describe un método para diagnosticar una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto, cuyo método 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 afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en base a la presencia o cantidad de expresión del polipéptido. Un método de diagnóstico de una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto puede comprender: (a) determinar la presencia o cantidad de transcripción o traducción de un polinucleótido K-ras mutante en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en base a la presencia o cantidad de transcripción o traducción del polinucleótido. La enfermedad o afección pueden ser cáncer.

Un método de diagnóstico de una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto puede comprender: (a) determinar la presencia o cantidad de expresión de un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 16, y SEQ ID NO: 18; y (b) diagnosticar una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en base a la presencia o cantidad de expresión del polipéptido. Un método de diagnóstico de una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto puede comprender: (a) determinar la presencia o cantidad de transcripción o traducción de un polinucleótido que codifica al menos la secuencia aminoácidos seleccionada de entre el SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 16, y SEQ ID NO: 18 en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en base a la presencia o cantidad de transcripción o traducción del polinucleótido. La enfermedad o afección pueden ser cáncer.

En la presente memoria se describe un método para diagnosticar una susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto. Un método de diagnóstico de una susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto puede comprender: (a) determinar la presencia o cantidad de expresión de un polipéptido de K-ras mutante en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en base a la presencia o cantidad de expresión del polipéptido. Un método de diagnóstico de una susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto puede comprender: (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 susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en base a la presencia o cantidad de transcripción o traducción del polinucleótido. La enfermedad o afección pueden ser cáncer.

- 5 Un método de diagnóstico de una susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto puede comprender: (a) determinar la presencia o cantidad de expresión de un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 16, y SEQ ID NO: 18 en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en base a la presencia o cantidad de expresión del polipéptido. Un método de diagnóstico de una susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en un sujeto puede comprender: (a) determinar la presencia o cantidad de transcripción o traducción de un polinucleótido que codifica al menos una aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 16, y SEQ ID NO: 18 en una muestra del sujeto; y (b) diagnosticar una susceptibilidad a una enfermedad o afección que están relacionadas con una o más mutaciones K-ras en base a la presencia o cantidad de transcripción o traducción del polipéptido. La enfermedad o afección pueden ser cáncer.

20 En la presente memoria se describe un método para determinar la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido de K-ras mutante. Un método para determinar la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido de K-ras mutante en una muestra puede comprender (a) exponer una muestra a una sonda que hibrida con un polinucleótido que codifica una región de un polipéptido de K-ras mutante, en donde la región comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada entre G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A, G13D, y T20M, y (b) determinar la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido de K-ras mutante en la muestra. Un método para determinar la presencia o ausencia de un polipéptido de K-ras mutante en una muestra puede comprender (a) exponer una muestra a una sonda que hibrida con un polinucleótido que codifica una región de un polipéptido de K-ras mutante, en donde la región comprende al menos una mutación de K-ras seleccionada entre G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A, G13D, y T20M, y (b) determinar la presencia o ausencia de un polipéptido de K-ras mutante en la muestra.

30 En la presente memoria se describe un método para establecer un perfil de la población mutante de K-ras 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. Las características específicas de los individuos pueden incluir una susceptibilidad a desarrollar una enfermedad o afección que están relacionadas con una mutación de K-ras. En algunas de tales realizaciones, las características específicas de los individuos incluyen exhibir una enfermedad o afección que están relacionadas con una mutación de K-ras.

40 En ciertas realizaciones, se proporciona un método de predicción de la falta de respuesta al tratamiento con panitumumab en un sujeto que sufre de cáncer colorrectal, que comprende determinar la presencia o ausencia de la mutación de K-ras G12S en el sujeto.

45 En ciertas realizaciones, se proporciona un método de predicción de la falta de respuesta al tratamiento con panitumumab en un sujeto que sufre de cáncer colorrectal, que comprende determinar la presencia o ausencia de la mutación de K-ras G12V en el sujeto.

50 En ciertas realizaciones, se proporciona un método de predicción de la falta de respuesta al tratamiento con panitumumab en un sujeto que sufre de cáncer colorrectal, que comprende determinar la presencia o ausencia de la mutación de K-ras G12D en el sujeto.

55 En ciertas realizaciones, se proporciona un método de predicción de la falta de respuesta al tratamiento con panitumumab en un sujeto que sufre de cáncer colorrectal, que comprende determinar la presencia o ausencia de la mutación de K-ras G12A en el sujeto.

60 En ciertas realizaciones, se proporciona un método de predicción de la falta de respuesta al tratamiento con panitumumab en un sujeto que sufre de cáncer colorrectal, que comprende determinar la presencia o ausencia de la mutación de K-ras G12C en el sujeto.

65 En ciertas realizaciones, se proporciona un método de predicción de la falta de respuesta al tratamiento con panitumumab en un sujeto que sufre de cáncer colorrectal, que comprende determinar la presencia o ausencia de la mutación de K-ras G13D en el sujeto.

En la presente memoria se describe un método de predicción de la falta de respuesta 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 amino ácido 13 y/o el aminoácido 20 de K-ras en el sujeto. Un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr puede ser un anticuerpo contra EGFr. El anticuerpo puede ser el panitumumab.

5 La falta de respuesta al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr se puede determinar utilizando los criterios RECIST (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos). La respuesta completa y la respuesta parcial de acuerdo con los criterios RECIST son consideradas ambas como sensibles al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. Se consiera que tanto la enfermedad estable como la enfermedad progresiva no responden al tratamiento con un agente de unión específica a un polipéptido de EGFr. Los RECIST son conocidos en la técnica y son descritos, p. ej., por 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.

En ciertas realizaciones, se detecta una mutación de K-ras. En ciertas realizaciones, se detecta una mutación de K-ras mediante la detección del polinucleótido de K-ras mutante. En ciertas realizaciones, se detecta una mutación de K-ras mediante la detección del polipéptido de K-ras mutante. 15

Ciertos métodos de detección de una mutación en un polinucleótido que son conocidos en la técnica. Ciertos métodos ilustrativos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, secuenciación, reacciones de extensión del cebador, electroforesis, ensayos de Picogreen, ensayos de ligación de oligonucleótidos, ensayos de hibridación, ensayos TaqMan, ensayos de SNPlex, y ensayos descritos, p. ej., en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 20 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 de los Estados Unidos 2003-0190646 A1.

En ciertas realizaciones, la detección de una mutación en un polinucleótido comprende amplificar primero un polinucleótido que puede comprender la mutación. Ciertos métodos para la amplificación de un polinucleótido son conocidos en la técnica. Tales productos de amplificación se pueden utilizar en cualquiera de los métodos descritos en este documento, o conocidos en la técnica, para la detección de una mutación en un polinucleótido. 25

Ciertos métodos de detección de una mutación en un polipéptido son conocidos en la técnica. Ciertos métodos ilustrativos de tales métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, la detección utilizando 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. 30

Algunos métodos ilustrativos para la detección de una mutación en un polinucleótido y/o un polipéptido se describen, por ejemplo, en Schimanski et al. (1999) Cancer Res., 59: 5169-5175; Nagasaka et al. (2004) J. Clin. Oncol., 22: 4584-4596; la Publicación PCT Núm. WO 2007/001868 A1; la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2005/0272083 A1; y Lievre y col. (2006) Cancer Res. 66: 3992-3994. 35

En la presente memoria se describen micromatrices que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de K-ras mutante. En la presente memoria se describen micromatrices que comprenden uno o más polinucleótidos H complementarios a uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de K-ras mutante. 40

En ciertas realizaciones, la presencia o ausencia de uno o más polinucleótidos de K-ras mutante en dos o más muestras de células o tejido se evalúa utilizando la tecnología de micromatrices. En ciertas realizaciones, se evaluó la cantidad de uno o más polinucleótidos de K-ras mutante en dos o más muestras de células o de tejidos utilizando la tecnología de micromatrices. 45

En ciertas realizaciones, se evalúa la presencia o ausencia de uno o más polipéptidos mutantes K-ras en dos o más muestras de células o de tejido utilizando la tecnología de micromatrices. En algunas de tales realizaciones, el ARNm se extrae primero a partir de una muestra de células o tejido y posteriormente se convierte en ADNc, que hibrida con la micromatriz. En algunas de tales realizaciones, la presencia o ausencia de ADNc que se une específicamente a la micromatriz es indicativa de la presencia o ausencia del polipéptido de K-ras mutante. En algunas de tales realizaciones, el nivel de expresión de los uno o más polipéptidos de K-ras mutante se evalúa cuantificando la cantidad de ADNc que se une específicamente a la micromatriz. 50 55

En ciertas realizaciones, se proporcionan los micromatrices que comprenden uno o más agentes de unión específicos a uno o más polipéptidos de K-ras mutante. En algunas de tales realizaciones, se evalúa la presencia o ausencia de uno o más polipéptidos de K-ras mutante en una célula o tejido. En algunas de tales realizaciones, se evalúa la cantidad de uno o más polipéptidos de K-ras mutante en una célula o tejido. 60

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes en las reivindicaciones.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de mutaciones en el exón 2 de K-ras muestras tumorales de adenocarcinoma colorrectal

10 Para identificar las mutaciones en el exón 2 de K-ras asociado con adenocarcinoma colorrectal ("CRC"), el exón 2 de K-ras se amplificó a partir de treinta y siete tumores de pacientes de CRC. Las muestras tumorales de doble ciego de treinta y siete pacientes incluidos en un ensayo CRC se obtuvieron antes del tratamiento del paciente con panitumumab. El estudio fue un ensayo clínico multicéntrico, abierto, de un solo brazo. Los pacientes se trataron con 15 2,5 mg/kg de panitumumab semanalmente, repetido en un ciclo de 8 semanas hasta la progresión de la enfermedad. Las evaluaciones tumorales se realizaron mediante una revisión radiológica central ciega (un panel de al menos 2 radiólogos), utilizando criterios RECIST y se confirmaron no menos de 4 semanas después de reunir por primera vez los criterios de respuesta. Cada exón aislado se secuenció para identificar las alteraciones de las secuencias de tipo salvaje para esos exones.

20 Se recogieron muestras de tumores CRC, de treinta y siete pacientes. Una porción de cada muestra de tumor se tiñó para identificar la cantidad de expresión de EGFr del tumor y se clasificó para la tinción en una escala de tres puntos (donde 3 es el mayor grado de tinción). Al menos 10% de cada muestra de tumor demostró un nivel de tinción de tres. El tejido tumoral se separó del tejido normal adyacente, restos necróticos, y estroma mediante disección macro de secciones de tejidos incluidas en parafina, fijadas en formol. Las muestras recortadas se fijaron en portaobjetos 25 de microscopio y se almacenan a temperatura ambiente.

Tabla 1: Muestras de pacientes de CRC

| Número de Histología | Número de Paciente | Número de Paciente del Ensayo Clínico |
|----------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 05H-5699EB | 17040 | 5149 |
| 04H-405CSB | 17043 | 5152 |
| 04H-406DB | 17046 | 5139 |
| 05H-5700NM | 17049 | 5150 |
| 05H-5698RBR | 17052 | 5147 |
| 05H-5692SM | 17055 | 5093 |
| 05H-5783JMY | 17061 | 5143 |
| 04H-413EED | 17066 | 5151 |
| 05H-5694CS | 17069 | 5141 |
| 05H-5689RBA | 17075 | 5072 |
| 05H-5697IAM | 17078 | 5145 |
| 04H-746XC | 18215 | 5101 |
| 04H-747SH | 18230 | 5133 |
| 04H-748JA | 18244 | 5097 |
| 04H-750GR | 18275 | 5115 |
| 04H-752HBM | 18321 | 5105 |
| 04H-753JR | 18333 | 5106 |
| 04H-754BLB | 18347 | 5113 |
| 04H-755JE | 18361 | 5110 |
| 04H-758GDM | 18396 | 5120 |
| 04H-759JH | 18410 | 5123 |

| Número de Histología | Número de Paciente | Número de Paciente del Ensayo Clínico |
|----------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 04H-760OGM | 18422 | 5124 |
| 04H-762GRK | 18449 | 5131 |
| 04H-763CHK | 18463 | 5129 |
| 04H-765DB | 18491 | 5136 |
| 04H-766LA | 18505 | 5137 |
| 04H-768LGL | 18526 | 5119 |
| 04H-771WRH | 18554 | 5102 |
| 04H-772CEM | 18569 | 5125 |
| 04H-773LOO | 18583 | 5096 |
| 04H-775BM | 18614 | 5107 |
| 04H-776LAP | 18628 | 5108 |
| 04H-780GL | 18688 | 5135 |
| 04H-781JLK | 18702 | 5121 |
| 05H-5686FEC | 23458 | 5030 |
| 05H-5690JFF | 23481 | 5079 |
| 05H-5696REF | 23534 | 5144 |

El ADN genómico se preparó a partir de los portaobjetos de muestra utilizando Pinpoint Slide DNA Isolation System (Zymo Research, Orange, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El producto de ADN genómico aislado final se disolvió en 500 µl de agua.

5 La secuencia de polipéptido de K-ras de tipo salvaje se muestra en la Figura 1A (SEQ ID NO: 2; Núm. de Acceso Genbank NP_004976). La secuencia de ADNc de K-ras de tipo salvaje también se muestra en la Figura 1A (SEQ ID NO: 1; Núm. de Acceso Genbank NM_004985). La secuencia de nucleótidos de K-ras de tipo salvaje genómico se encuentra en el Núm. de Acceso Genbank NM_004985. Las secuencias de los cebadores para cada exón se diseñaron utilizando las secuencias intrónicas 5' y 3' para el exón 2 en la secuencia de ADNc de K-ras de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1). Las secuencias correspondientes al exón 2 de K-ras humano se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores específicos: cebador 3401-41 (5'-AAGGTACTGGTGGAGTATTG-3' SEC ID NO. 19) y el cebador 3401-44 (5'-GTACTCATGAAAATGGTCAGAG-3' SEQ ID NO. 20).

15 La PCR se realizó con ADN polimerasa Taq (Roche Diagnostics Corp) o equivalente y las siguientes condiciones: se combinaron y mezclaron 5 µl de 10x tampón de Taq, 0,5 mM de MgCl₂ 24 mM, 1 µl de ADN genómico (aproximadamente 0,5 ng), 7 µl de dNTP 2,5 mM, 1 µl de polimerasa Taq (5U) y 29,5 µl ddH₂O. Se añadieron a cada tubo 6 µl de provisión de partida de cebadores combinados (10 mM de cada uno). El protocolo de ciclo fue de 1 ciclo de 4 minutos a 93°C; 10 segundos a 93°C, 30 segundos a 62°C, 30 segundos a 72°C durante 35 ciclos; y 1 ciclo de 4 minutos a 72°C. Al final de la reacción la temperatura se mantuvo a 4°C.

25 Los productos de PCR para cada exón individual se purificaron en gel. Las secuencias exónicas amplificadas purificadas se subclonaron en un vector pCR2.1 usando un kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen Corp) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recogieron las colonias de *E. coli* que contenían el vector y el exón insertado de interés mediante un Genetix Colony Picker. Estas colonias se cultivaron durante la noche en medio líquido. El ADN plasmídico de cada cultivo bacteriano durante la noche se aisló usando un QIAGEN Bio-Robot 9600, 3000, u 8000 (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

30 El ADN plásmido aislado que contenía cada exón se secuenció utilizando un kit BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos de secuenciación se recogieron mediante un Analizador Genético 3700, 3100 o 3730 (Applied Biosystems, Inc.), y se analizaron utilizando el programa Sequencher (GeneCodes Corp.). Las secuencias exónicas de las muestras de los pacientes se compararon con las secuencias exónicas de tipo salvaje.

35 El análisis mutacional de las muestras tumorales de pacientes de CRC, identificó 13 pacientes con una mutación en el exón 2 de K-ras (Tabla 2). La respuesta tumoral se evaluó a través de CT o MRI y se analizó estadísticamente utilizando RECIST (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos), que establece las directrices para la

identificación de la respuesta completa, la respuesta parcial, la enfermedad estable o la progresión de la enfermedad basándose en el tamaño del tumor (véase, p. ej., 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).

5

Tabla 2: Resultado de muestras de pacientes de CRC

| PTS ID | Mutación | Respuesta |
|--------|------------|-----------|
| 5149 | WT | EP |
| 5152 | G12S | EP |
| 5139 | G12V | EP |
| 5150 | WT | EP |
| 5147 | WT | EP |
| 5093 | G12D | EE |
| 5143 | G13D | EP |
| 5151 | WT | EP |
| 5141 | G12V | EP |
| 5072 | WT | EP |
| 5145 | WT | EE |
| 5101 | WT | EE |
| 5133 | WT | EE |
| 5097 | WT | RP |
| 5115 | G12A | EE |
| 5105 | WT | RP |
| 5106 | G12D | EP |
| 5113 | G12C | EP |
| 5110 | WT | EE |
| 5120 | WT | RP |
| 5123 | WT | EE |
| 5124 | WT | EP |
| 5131 | WT | EP |
| 5129 | WT | EE |
| 5136 | WT | EP |
| 5137 | G12V | EP |
| 5119 | WT | EE |
| 5102 | G12V | EP |
| 5125 | G12V, T20M | EE |
| 5096 | WT | EE |
| 5107 | G12D | EP |
| 5108 | WT | EP |
| 5135 | WT | EE |
| 5121 | WT | EE |
| 5030 | WT | RP |
| 5079 | WT | EE |

| PTS ID | Mutación | Respuesta |
|--------|----------|-----------|
| 5144 | G12D | EP |

EP es sinónimo de enfermedad progresiva, RP es sinónimo de respuesta parcial y EE significa enfermedad estable.

- 5 De los treinta y siete tumores, 13 tenían mutaciones en el exón 2 de K-ras (36%) y 24 eran de tipo salvaje en el exón 2 de K-ras (64%). De los 13 tumores con una mutación en el exón 2 de K-ras, ninguno (0%) mostró una respuesta parcial a panitumumab. En contraste, 4 de los tumores con el exón 2 de K-ras de tipo salvaje (17%) mostraron una respuesta parcial a panitumumab. Del mismo modo, sólo 3 (23%) de los tumores con una mutación en el exón 2 mostraron estabilización de la enfermedad después del tratamiento panitumumab, mientras que 11 (46%) de los tumores con el exón 2 de K-ras de tipo salvaje mostraron estabilización de la enfermedad. Finalmente, 10 (77%) de los tumores con una mutación en el exón 2 mostraron enfermedad progresiva después del tratamiento con panitumumab, mientras que sólo 9 (37%) de los tumores con el exón 2 de K-ras de tipo salvaje mostraron enfermedad progresiva.
- 10
- 15 Estos datos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen del estado de mutación del paciente de CRC y respuesta al panitumumab

| | mut+ | mut- |
|----|----------|----------|
| RP | 0 (0%) | 4 (17%) |
| EE | 3 (23%) | 11 (46%) |
| EP | 10 (77%) | 9 (37%) |

- 20 En ese análisis, una mutación en el exón 2 de K-ras, especialmente las mutaciones G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A, G13D y T20M, se correlacionaron con la falta de respuesta a la terapia con panitumumab.

LISTA DE SECUENCIAS

- 25 <110> Freeman, Daniel
 Juan, Todd
 Radinsky, Robert
 <120> Mutaciones en K-ras y terapia con anticuerpos anti-EGFr
 <130> 6843.118-304
 30 <150> 60/906,943
 <151> 2007-03-13
 <160> 18
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 35 <211> 567
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

40

ES 2 458 626 T3

atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctggtggcg 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
 ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

5 <210> 2
 <211> 188
 <212> PTR
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

10 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

ES 2 458 626 T3

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
 5 <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 atattctoga cacagcaggt 180
 caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaattcct 420
 ttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

10 <210> 4
 <211> 188
 <212> PTR
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

15

ES 2 458 626 T3

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 gctggtggcg taggcaagag tgccttgacg 60

10

ES 2 458 626 T3

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
 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> PTR
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

5

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

10

ES 2 458 626 T3

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

5

atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctgctggcg 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 atggctcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

10

<210> 10
 <211> 188
 <212> PTR
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

15

ES 2 458 626 T3

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

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

10

ES 2 458 626 T3

gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
 aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggctctag 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> 12
 <211> 188
 <212> PTR
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

5

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

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

10

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

15

ES 2 458 626 T3

atgactgaat ataaaacttgt ggtagttgga 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
 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> 14

<211> 188

<212> PTR

<213> Homo sapiens

<400> 14

5

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

ES 2 458 626 T3

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
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 15

atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctggtgacg 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
 ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

- 10 <210> 16
- <211> 188
- <212> PTR
- <213> Homo sapiens
- 15 <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

ES 2 458 626 T3

<211> 188
 <212> PTR
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

5

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

Ser Ala Leu Met 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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para predecir si un paciente que sufre de cáncer colorrectal no responderá al tratamiento con panitumumab, que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en un tumor de dicho paciente, en donde la mutación de K-ras se selecciona entre G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, y G13D; y en donde si está presente una mutación de K-ras, se pronostica que el paciente no responderá al tratamiento con panitumumab.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación de la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en un tumor comprende la amplificación de un ácido nucleico de K-ras del tumor y la secuenciación del ácido nucleico amplificado.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación de la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en el tumor comprende la detección de un polipéptido de K-ras mutante en una muestra del tumor utilizando un agente de unión específica a un polipéptido de K-ras mutante.
- 20 4. Un método para predecir si un tumor de un de cáncer colorrectal no responderá al tratamiento con panitumumab, que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en una muestra de dicho tumor, en donde la mutación de K-ras se selecciona entre G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, y G13D; y en donde la presencia de la mutación de K-ras indica que el tumor no responderá al tratamiento con panitumumab.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en donde la etapa de determinación de la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en la muestra de dicho tumor comprende la amplificación de un ácido nucleico de K-ras del tumor y la secuenciación del ácido nucleico amplificado.
- 30 6. El método de la reivindicación 4, en donde la etapa de determinación de la presencia o ausencia de una mutación de K-ras en la muestra de dicho tumor comprende la detección de un polipéptido mutante de K-ras utilizando un agente de unión específica a un polipéptido mutante de K-ras.

FIGURA 1A

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

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTTGA GCTGGTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACC ATACAGCTAA 70
 TTCAGATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAAC TGCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTGCGCA TAAATAATAC TAAATCATT GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGAACAAAT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAATATA 350
 ATGTGATTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTGATG ATGCCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAG TCAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

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

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDFIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTEGFLC VFAINNPKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKSEEDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKERM SKDGKTKKKK SKTKCVIM 188

FIGURA 1B

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

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTAGTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTGGCA TAAATAATAC TAAATCATTI GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAA GACAAGACAG GGTGTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

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

MTEYKLVVVG ASGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRTEGEGFLC VFAINNPKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKEM SKDGKSKKKK SKTKCVIM 188

FIGURA 1C

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

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGTTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCAATTT GAAGATAATC 280
 ACCATTATAG AGAACAAATTT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATTA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAGACAA AGTGTGTAAAT 560
 TATGTAA 567

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

MTEYKLVVVG AVGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRTEGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKKEK SKDGKTKKKK SKTKCVIM 188

FIGURA 1D

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

ATGACTGAAT ATAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGATGGCG TAGGCACAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTGG ATATCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATTT GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

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

MTEYKLVVVG ADGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDFTAG QEYSAMRDQ YMRTEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKMKM SKDGKTKKMK SKTKCVIM 188

FIGURA 1E

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

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGCTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATCTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATTT GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

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

MTEYKLVVVG AAGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRTEGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKTKKKK SKTKCVIM 188

FIGURA 1F

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

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTTGTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATCTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCAATTT GAAGATATTC 280
 ACCATATATAG AGAACAAAT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

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

MTEYKLVVVG ACGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRTEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKTKKKK SKTKCVIM 188

FIGURA 1G

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

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGCCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCAFTT GAAGATATTC 280
 ACCATTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

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

MTEYKLVVVVAGAVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRGTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKEM SKDGKTKKSK SKTKCVIM 188

FIGURA 1H

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

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGACG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGCTCTTGG ATATCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATTT GAAGATATTC 280
 ACCATATAG AGAACAAAT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATAA 350
 ATGTGATTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATTGAAA CATCAGCAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
 GAAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

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

MTEYKLVVVG AGDVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRGTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKEM SKDGKKKKK SKTKCVIM 188

FIGURA 1I

(SEQ ID NO: 17) ADNc de K-ras (T20M)

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGATG ATACAGCTAA 70
 TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
 TGGAGAAACC TGTCTCTTGG ATATCTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
 TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCAATTT GAAGATATTC 280
 ACCATATAG AGAACAAATTT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCCTAG TAGGAAATAA 350
 ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
 TTTATIGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTTGATG ATGCCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAAATTC 490
 GAAAACATAA AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
 TATGTAA 567

(SEQ ID NO: 18) Secuencia de aminoácidos de K-ras (T20M)

MTEYKLVVVG AGGVGKSALM IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
 CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRTEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
 KRVKDSEDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
 GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKTKKKK SKTKCVIM 188