

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 723**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2010 E 10721033 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2440931**

54 Título: **Método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral y un kit para llevar a cabo dicho método**

30 Prioridad:

10.06.2009 ES 200930294

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2015

73 Titular/es:

SIERRA JIMÉNEZ, ANGELS (100.0%)
Riera Villaret, 83-91, 5 I
08208 Sabadell, Barcelona, ES

72 Inventor/es:

SANZ PAMPLONA, REBECA;
SIERRA JIMÉNEZ, ANGELS;
OLIVA MIGUEL, BALDOMERO;
MORENO AGUADO, VÍCTOR RAÚL y
GIL GIL, JUAN MIGUEL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 539 723 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral y un kit para llevar a cabo dicho método

La presente invención se refiere a marcadores indicativos de metástasis cerebral. Estos marcadores encuentran utilidad en la determinación del riesgo de desarrollar metástasis, en particular metástasis cerebral.

5 Antecedentes de la técnica

El cáncer es un proceso que acontece en múltiples etapas y aparece como resultado de la pérdida de control de la división celular, conduciendo a la formación de un tumor inicial que después puede diseminarse, y desarrollar un tumor en un órgano distante o metástasis.

10 Una característica diferencial de las células malignas es su capacidad para invadir tejido normal circundante, metastatizar a través de los sistemas sanguíneo y linfático y reestablecerse en localizaciones secundarias distantes. Para formar metástasis, las células tumorales individuales deben desprenderse de la masa tumoral primaria, degradar la matriz extracelular, invadir el tejido normal circundante, entrar en la circulación sanguínea o linfática, abandonar la circulación en un tejido distal y establecer colonias satélite dentro de este nuevo entorno tisular. Este comportamiento requiere la función cooperativa de numerosas proteínas. Esta diseminación metastásica del tumor
15 sólido es responsable directa o indirectamente de la mayoría de las muertes relacionadas con cáncer.

El tratamiento clínico del cáncer puede ayudarse de marcadores de pronóstico y de marcadores predictivos terapéuticos. Los marcadores de pronóstico evalúan el riesgo de avance de la enfermedad independiente de la terapia. Los marcadores predictivos terapéuticos indican la sensibilidad o resistencia de un cáncer a un tratamiento específico. Para la mayoría de los cánceres y tratamientos del cáncer, existen subconjuntos de pacientes que
20 responderán a un tratamiento particular y subconjuntos de pacientes que no responderán al tratamiento.

El uso de marcadores predictivos terapéuticos para identificar subconjuntos de pacientes que probablemente respondan al tratamiento, facilitaría la selección de un tratamiento apropiado y evitaría retrasos innecesarios asociados con un tratamiento ineficaz. Además, debido a que la mayoría de los tratamientos de cáncer se asocian con efectos secundarios adversos intrínsecos al tratamiento, dichos marcadores predictivos eliminan riesgos
25 innecesarios de efectos secundarios adversos reduciendo la administración de tratamientos de cáncer a individuos en los que es probable que el tratamiento falle.

Actualmente, los únicos marcadores predictivos terapéuticos recomendados en oncología son el estado de ER (receptor de estrógenos) y PR (receptor de progesterona) para seleccionar cánceres de mama sensibles a hormonas, y HERB-2 para identificar pacientes con cáncer de mama que podrían beneficiarse del tratamiento con trastuzumab.
30

La incidencia de metástasis cerebral en pacientes con cáncer de mama que expresan en exceso HERB-2 tratados con trastuzumab es el doble que en otros pacientes con cáncer de mama. Por otra parte un tercio de los pacientes con cáncer de mama desarrollará metástasis en el SNC y, con frecuencia, esto se produce cuando están respondiendo a la terapia en otros sitios o tienen una enfermedad estable. Por lo tanto, los fármacos con un alto
35 impacto sobre la evolución clínica de pacientes con cáncer de mama metastásico, tales como taxanos o trastuzumab, desempeñan solamente un papel limitado en el tratamiento de la metástasis cerebral (Tosoni A. *et al.*, "Chemotherapy in breast cancer patients with brain metastases: Have new chemotherapeutic agents changed the clinical outcome?", *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2008, vol. 68 (3), págs. 212-221). La resistencia a agentes dirigidos contra HERB-2 continúa siendo un problema médico importante ya que muchos cánceres positivos para HERB-2
40 presentan una resistencia intrínseca.

Las metástasis cerebrales ocurren en el 10-15% de los pacientes con cáncer de mama con la enfermedad avanzada y recientemente se han convertido en un problema médico significativo. Puede suponerse que hasta un 30% de los pacientes con cáncer de mama metastásico experimentarán metástasis cerebral durante el curso de su enfermedad. El aumento en este índice podría estar relacionado con una mayor supervivencia en pacientes que reciben
45 quimioterapia y con el hecho de que es difícil superar la barrera hematoencefálica (BHE) con los tratamientos sistémicos actuales. Las dificultades en el manejo de la terapia de metástasis cerebral dan como resultado una supervivencia media de siete meses, siendo la metástasis cerebral la causa de muerte o un factor contribuyente principal de la misma en el 68% de los pacientes.

Es necesaria una estimación adecuada de factores predictivos independientes en el diagnóstico del tumor inicial para permitir al médico determinar si dicho tumor puede metastatizar. Esta información sería útil para el médico para decidir entre tratamientos agresivos, evitar un tratamiento innecesario y diseñar terapias específicamente dirigidas
50 contra aspectos diferenciales de cada localización metastásica.

La solicitud de patente europea EP1961825A1 muestra características metastáticas específicas de órgano basadas en la determinación del nivel de expresión de marcadores que son expresados de forma diferente en metástasis de pulmón, hueso y cerebro en un sujeto al que se ha diagnosticado tumor de mama.
55

Además, se ha desarrollado la caracterización de fenotipos funcionales que pueden potenciar la metástasis cerebral en cánceres de mama humanos. Se ha encontrado que las proteínas ARGFGAP, RNF25, EHMT2, TOP1, RNPC2, eIF-3, MCM4, GRP94, FN14 y INHA (característica de metástasis cerebral específica METABRE) son expresadas de forma diferente en muestras de metástasis cerebral (Sanz et al., 2006, *Europ. J. of Cancer Suppl.*, 4: 165).

- 5 Por lo tanto, existe la necesidad de marcadores predictivos que proporcionen información acerca del riesgo de que un tumor primario metastatice a otros órganos para tratar eficazmente la enfermedad.

Resumen de la invención

10 Hasta ahora, poco se sabía sobre los factores predictivos que permiten la identificación temprana de pacientes con cáncer primario con riesgo de metástasis en el sistema nervioso central ("SNC"). El análisis de tejidos metastásicos, el uso de procedimientos bioinformáticas y la caracterización de la expresión de proteínas en tumores con metástasis específica a un determinado órgano han permitido a los inventores de la presente solicitud encontrar marcadores que proporcionan una información específica acerca de si las células cancerosas tienen una predisposición a metastatizar.

15 Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral en un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor de mama, comprendiendo el método: (a) determinar el nivel de expresión de GRP94 en una muestra aislada del tumor de mama, ; y (b) comparar dicho nivel con el nivel de dicho gen en una muestra de control, de manera que si se detecta un exceso de expresión de dicho gen en relación con la muestra de control, esto es indicativo del riesgo de desarrollar metástasis cerebral.

20 Como se muestra más abajo, los autores de la invención han analizado en profundidad las rutas patogénicas que intervienen en la metástasis cerebral mediante el análisis de la expresión de proteínas en tejidos de cerebro humano metastásico y de tumores de mama primarios, junto con el análisis funcional adicional de las células. De esta forma, se ha identificado un fenotipo de resistencia al estrés del retículo endoplásmico (en lo sucesivo también denominado "ERSRP") en cánceres de mama, que predice la evolución a metástasis cerebral y que, al mismo tiempo, es útil para tomar decisiones terapéuticas. Sin estar ligado a teoría alguna, se cree que dicho ERSRP se basa principalmente en el nivel de expresión incrementado de GRP94.

25 Sorprendentemente, los autores de la invención han descubierto que GRP94 y FN14 se expresan de forma diferencial (es decir, son expresados en exceso) en muestras de tumor de mama primario procedentes de pacientes a los que ya se les ha diagnosticado metástasis cerebral. De hecho, el perfil de expresión de estos genes en las muestras de tumor de mama primario procedentes de estos pacientes fue el mismo que el que se encontró después de analizar muestras de metástasis cerebral. Estos descubrimientos respaldan el uso de estos genes como marcadores predictivos de metástasis cerebral en tumores de mama primarios.

30 La expresión diferencial de GRP94 puede conferir al método una mayor sensibilidad, mejorando la capacidad de discriminación (principalmente porque la no detección de GRP94 será indicativa de que no existe riesgo de metástasis cerebral) y, de este modo, reduciendo los falsos negativos asociados a otros métodos de diagnóstico basados en la detección de otros marcadores tales como HERB-2 (véanse los datos que se muestran en la Tabla 2).

35 Como se ha descrito anteriormente, la metástasis es un proceso complejo. Esta complejidad hace impredecible si un tumor primario puede metastatizar y qué órgano u órganos pueden verse afectados por la metástasis. En este sentido, el médico tiene el problema adicional de que la metástasis se detecta en una fase avanzada ya que las primeras fases son "silenciosas", de modo que cuando se detecta, mediante técnicas de imágenes, es muy difícil tratar eficazmente al paciente.

40 De acuerdo con el método del primer aspecto de la invención, si el médico, después de analizar la muestra de cáncer de mama, determina el exceso de expresión de GRP94, entonces puede realizar un análisis adicional mediante técnicas de imagen, por ejemplo RMN, del cerebro para confirmar si se ha producido o no la metástasis cerebral. Para el médico esto es de importancia porque le permitiría establecer el protocolo apropiado para el paciente, determinando qué tratamiento puede ser el más eficaz con el fin de tratar/prevenir la enfermedad: si el análisis por imágenes pone de manifiesto la metástasis cerebral, el médico diseñará el tratamiento específico, con la ventaja de que se habrá diagnosticado en un estadio temprano; si no, el médico puede establecer un protocolo para controlar periódicamente al paciente con un análisis de RMN para el diagnóstico temprano de la metástasis cerebral y darle al paciente un tratamiento preventivo. Esto supone un gran avance en el campo del cáncer ya que permite predecir en un estado temprano la predisposición a metástasis cerebral, lo cual puede conducir a una reducción de la incidencia final de la metástasis cerebral en el cáncer de mama y realmente un aumento de la supervivencia.

45 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit para llevar a cabo el método que se ha definido en el primer aspecto de la invención, consistiendo el kit en medios apropiados para determinar el nivel de expresión de cada uno de los siguientes marcadores:

- (a) GRP94 y FN14;
- (b) GRP94, FN14 e inhibina;
- (c) GRP94, TRAF2, HERB2 y FN14;
- (d) GRP94, FN14, inhibina y HERB-2; y

5 (e) GRP94, FN14 y TRAF2,

en donde dichos medios adecuados son moléculas capaces de unirse específicamente a la proteína codificada por cada uno de dichos genes, en donde dichas moléculas se seleccionan de anticuerpos o fragmentos de los mismos y ácidos nucleicos aptámeros.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y variantes de la palabra, tales como "que comprende", no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia serán evidentes objetos, ventajas y características adicionales de la invención tras el examen de la descripción o se pueden aprender en la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

15 La fig. 1 representa el análisis inmunohistoquímico para identificar las proteínas indicadas en parejas de tumor-metástasis cerebral embebidas en parafina (x 20). Se muestra la tinción con hematoxilina-eosina (H y E) de cada tejido, observada mediante microscopía óptica (x 10). A: Metástasis, B: Tumor primario.

20 La fig. 2 muestra la expresión de proteína en tejidos de cáncer de mama para cada una de las proteínas indicadas realizando análisis inmunohistoquímico. Las intensidades de tinción bajas y medias se consideraron negativas con fines semicuantitativos (L(-) y M(-), respectivamente), y sólo los tumores con una tinción de alta intensidad (H) se tuvieron en cuenta como muestras positivas. Los cuadrados pequeños son la muestra de tejido de control positivo patrón usada en cada determinación.

La fig. 3 representa la curva de ROC (SE (sensibilidad) frente a SP (especificidad)) para el marcador HERB-2 (línea de puntos) y para la combinación de GRP94 + FN14 + Inhibina (línea continua).

25 La fig. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de GRP94 disponible en la base de datos Swiss Prot con el número ID P14625.

La fig. 5 muestra la secuencia de aminoácidos de FN14 disponible en la base de datos Swiss Prot con el número ID Q9NP84.

30 La fig. 6 muestra la secuencia de aminoácidos de TRAF2 disponible en la base de datos Swiss Prot con el número ID Q96NT2.

La fig. 7 muestra la secuencia de aminoácidos de HERB2 disponible en la base de datos Swiss Prot con el número ID P04626.

La fig. 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la inhibina disponible en la base de datos Swiss Prot con el número ID P05111.

35 Descripción detallada de realizaciones particulares

La presente invención proporciona un método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral en un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor de mama primario, comprendiendo el método: (a) determinar el nivel de expresión de GRP94, en una muestra aislada del tumor de mama; y (b) comparar dicho nivel con el nivel de dicho gen en una muestra de control, de manera que si se detecta un exceso de expresión de dicho gen en relación con la muestra de control, esto es indicativo del riesgo de desarrollar metástasis cerebral.

40 La muestra control se selecciona dependiendo de la técnica, herramientas e instrucciones del fabricante usadas para determinar el nivel de expresión de GRP94 o de GRP94 y FN14. Por ejemplo, si se desea determinar el nivel de las proteínas GRP94 o de GRP94 y FN14, el experto en la técnica buscará los anticuerpos apropiados que se encuentran disponibles en el mercado y seguirá las recomendaciones del fabricante para obtener los mejores resultados. Se proporciona un ejemplo ilustrativo no limitante en la Tabla 1 de más abajo, en la que para cada uno de los anticuerpos comerciales usados para la detección de las proteínas diana, se usa un tejido de control específico. Como alternativa, el médico podría usar una muestra de cáncer de mama primario de un paciente al que ya se le ha diagnosticado metástasis cerebral como control con el fin de determinar si existe exceso de expresión o no en la muestra que se analiza.

50 La GRP94 (también conocida como HSP90B1, y que tiene el número ID de Swiss Prot P14625) es una proteína del

retículo endoplásmico de la familia de proteínas HSP90, con una longitud de 803 aminoácidos y con un peso molecular de 92.469 Da. La GRP94 está implicada en la maduración conformacional de proteínas destinadas a la presentación en la superficie celular o a la exportación. Los descubrimientos de los autores de la invención sugieren que GRP94 puede participar en ERSRP activando PERK, ATF6 e IRE1. Por lo tanto, el exceso de expresión de GRP94 en la metástasis cerebral puede jugar un papel central en un ERSRP.

En otra realización del primer aspecto de la invención, dicho método comprende además: (a) determinar el nivel de expresión de FN14, en una muestra aislada del tumor de mama; y (b) comparar dicho nivel con el nivel de FN14 en una muestra de control, de manera que si se detecta un exceso de expresión de dicho gen en relación con la muestra de control, esto es indicativo del riesgo de desarrollar metástasis cerebral.

El FN14 (también denominado factor inducible de crecimiento de fibroblastos 14, y que tiene el número ID de Swiss prot. Q9NP84) es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), con una longitud de secuencia de 129 aa y un peso molecular de 13.911 Da. El FN14 es un gen de respuesta temprana inmediata cuya expresión se activa directamente después de la exposición a factores de crecimiento en fibroblastos, y es regulado por aumento en células de glioma de migración estimulada *in vitro* y se ha relacionado con tumores de alto grado.

En una realización del primer aspecto de la invención, se determina el nivel de expresión de GRP94 y FN14.

Como muestran los resultados de la Tabla 3, GRP94 es el más sensible en los tumores positivos para HERB-2, mientras que FN14 es el más específico en tumores negativos para HERB-2. La detección combinada de ambos marcadores confiere al método de la presente invención una predicción fiable del riesgo de que un tumor de mama primario pueda metastatizar en el cerebro.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el método comprende además determinar el nivel de expresión de TRAF-2. Se ha descubierto que TRAF-2 es expresado en exceso en la metástasis cerebral en el cáncer de mama y que muestra un valor de sensibilidad superior al mostrado por HERB-2 (véase la Tabla 2). Por lo tanto, la combinación de GRP94 o de GRP94 y FN14 junto con TRAF2 mejora la sensibilidad del método de la presente invención.

Como se muestra más abajo, cuando se calcularon la probabilidad positiva y negativa con el fin de evaluar la exactitud predictiva de cada uno de los tres genes (es decir, GRP94, TRAF2 y FN14) como marcadores de metástasis cerebral, GRP94 fue el mejor marcador predictivo negativo, seguido de TRAF2 y FN14. De hecho, se descubrió que la exactitud predictiva de estos marcadores era mejor que la de HERB-2. Por lo tanto, la ausencia o la detección insignificante de al menos uno de estos marcadores en tumores predice con precisión la ausencia de metástasis cerebral.

El TRAF2 (también denominado "factor asociado a receptor de NF 2" y que tiene el número ID de Swiss protein Q96NT2) es un miembro de la familia de proteínas de factores asociados a los receptores de TNF (TRAF) con una longitud de 501 aa y peso molecular de 55.859 Da. Las proteínas TRAF median la transducción de señales de miembros de la superfamilia de receptores de TNF. Esta proteína interacciona directamente con receptores de TNF y forma un complejo heterodimérico con TRAF1.

En una realización del primer aspecto de la invención, el método comprende además determinar el nivel de expresión de HERB-2.

HERB-2 también se denomina también comúnmente Her-2/neu (número ID de Swiss protein P04626), con una longitud de 1.255 aa y peso molecular de 137.910 Da. Este gen es un miembro de una familia de genes que proporciona instrucciones para producir receptores de factores de crecimiento.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el método comprende además determinar el nivel de expresión de inhibina.

La inhibina (número ID de Swiss prot P05111) es un péptido que es un inhibidor de la síntesis y secreción de FSH y participa en la regulación del ciclo menstrual. La inhibina tiene una longitud de 366 aa y peso molecular de 39.670 Da.

Se ha descubierto que la inhibina no es expresada significativamente en muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes a los que ya se les ha diagnosticado una metástasis cerebral. Por lo tanto, cuando este marcador no se detecta o (no se detecta significativamente) en la muestra, será indicativo de una predisposición a desarrollar metástasis cerebral. Cuando se usa este marcador como marcador de metástasis cerebral, confiere al método de la invención una especificidad superior al 80%. Por lo tanto, si el método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de GRP94 y/o FN14 e inhibina, el método ganará exactitud en la predicción de metástasis cerebral.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el método comprende determinar el nivel de expresión de uno de los siguientes conjuntos de marcadores: (a) GRP94, FN14, inhibina; (b) GRP94, TRAF2, HERB-2 y FN14; (c) GRP94, FN14, inhibina y HERB-2; y (d) GRP94, FN14 y TRAF2.

- 5 Cuando el método se basa en determinar el exceso de expresión de GRP94, FN14 y TRAF2 (no se muestran los datos) se consigue una buena correlación con la metástasis cerebral en pacientes con cáncer de mama. El poder predictivo usando la combinación de estos marcadores es mejor que el conseguido solamente con HERB-2 (que de momento es el marcador predictivo usado habitualmente). El método basado en estos tres marcadores genéticos representa una nueva herramienta para discriminar el riesgo de metástasis cerebral en cánceres de mama positivos y negativos para HERB-2.
- Cualquiera de GRP94, FN14 y TRAF2 podría ser útil para tomar decisiones terapéuticas ya que podrían indicar respuesta a terapia.
- 10 Se cree que el ERSRP puede predecir qué pacientes podrían tratarse más eficazmente con compuestos diferentes de trastuzumab o incluso tratarse para prevenir el desarrollo de la enfermedad.
- La realización de un análisis multivariante basado en una regresión logística por pasos puso de manifiesto que GRP94, FN 14 y la inhibina son la mejor combinación para predecir la metástasis cerebral. El área bajo la curva ROC para esta combinación fue de 0,85, mientras que el área bajo la curva ROC para HERB-2 solo fue 0,76 (FIG. 3). La combinación de marcadores constituía una mejora significativa frente a la eficacia de predicción de HERB-2.
- 15 También se realizó una análisis estratificado para comprobar la relación entre la positividad de HERB-2 y ERSRP en combinaciones binarias. Se descubrió que realizando el análisis de la expresión de GRP94, TRAF2 y FN14 se aumentaba significativamente la predicción de la enfermedad metastásica en cerebro en comparación con HERB-2 solo.
- 20 El kit de acuerdo con el segundo aspecto de la invención consiste en medios adecuados para determinar el nivel de expresión de uno de los siguientes conjuntos de marcadores:
- (a) GRP94 y FN14;
 - (b) GRP94, FN14 e inhibina;
 - (c) GRP94, TRAF2, HERB2 y FN14;
 - (d) GRP94, FN14, inhibina y HERB-2; y
 - 25 (e) GRP94, FN14 y TRAF2,
- en donde dichos medios adecuados son moléculas capaces de unirse específicamente a la proteína codificada por cada uno de dichos genes, en donde dichas moléculas se seleccionan de anticuerpos o fragmentos de los mismos y ácidos nucleicos aptámeros.
- 30 La presencia de los marcadores que forman parte del método del primer aspecto de la invención puede determinarse basándose en los transcritos de ARNm o en las proteínas. De esta forma, el kit de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención incluirá medios apropiados para determinar la presencia de transcritos de ARNm o de la proteína correspondiente.
- Son bien conocidos en el estado de la técnica métodos y medios para determinar la cantidad de ARNm de un gen particular en una muestra.
- 35 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método más ampliamente usado para la amplificación enzimática *in vitro* de ácidos nucleicos, pero no es el único. La reacción en cadena de la ligasa (LCR), por ejemplo, puede usarse para la detección sensible de una secuencia de ADN con una especificidad aumentada en comparación con la PCR (la LCR puede usarse para la discriminación entre alelos). Durante la LCR, para cada una de las dos cadenas de ADN se ligan dos sondas parciales para formar la real; por lo tanto, la LCR usa dos enzimas:
- 40 una ADN polimerasa y una ADN ligasa. Cada ciclo da como resultado una duplicación de la molécula de ácido nucleico diana.
- Un método cuantitativo para la determinación de ácidos nucleicos es la PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real, también denominada PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR), se usa para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de ADN diana. El procedimiento sigue el principio general de la reacción en cadena de la polimerasa; su característica clave es que el ADN amplificado se cuantifica a medida que se acumula en la reacción en tiempo real después de cada ciclo de amplificación. Dos métodos comunes de cuantificación son el uso de colorantes fluorescentes que se intercalan con el ADN bicatenario y sondas oligonucleotídicas de ADN modificadas que presentan fluorescencia cuando hibridan con un ADN complementario.
- 45 Se han desarrollado estrategias adicionales basadas en la PCR original para la amplificación de ARN, tales como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). En esta técnica, se realiza primero una transcripción inversa de la cadena de ARN en su complementaria de ADN o su ADN complementario, seguida de amplificación del ADN resultante usando la reacción en cadena de la polimerasa. Otro método en la biología molecular que se usa para amplificar secuencias de ARN es la amplificación basada en secuencias de ácidos
- 50

nucleicos (NASBA). Explicada de forma resumida, la NASBA funciona de la forma siguiente: (a) se proporciona un molde de ARN a la mezcla de reacción y el primer cebador se une a su sitio complementario en el extremo 3' del molde; (b) la transcriptasa inversa sintetiza la cadena de ADN opuesta complementaria; (c) la ARNasa H destruye el molde de ARN (la ARNasa H sólo destruye el ARN en híbridos de ARN-ADN pero no el ARN monocatenario); (d) el segundo cebador se une al extremo 5' de la cadena de ADN y la ARN polimerasa 5'-T7 produce una cadena de ARN complementaria que puede usarse de nuevo en la etapa (a). La NASBA se ha introducido en el diagnóstico médico, donde se ha demostrado que proporciona resultados más rápidos que la PCR, y también puede ser más sensible. Tanto la RT-PCR como la NASBA son técnicas adecuadas para la determinación de la expresión de genes. Preferiblemente, el nivel de expresión de los genes se determina mediante RT-PCR.

- 10 Otras técnicas adecuadas para la determinación de la expresión génica son el cribado de macromatrices, cribado de micromatrices y cribado de nanomatrices.

15 Son bien conocidos en el estado de la técnica varios métodos para determinar la cantidad de una proteína en una muestra. Generalmente, estos métodos utilizarán restos de unión, que son moléculas o segmentos de moléculas capaces de unirse específicamente a la proteína diana (en el presente caso la proteína diana es la proteína codificada por el gen del que se determina la expresión). Pueden identificarse restos de unión a polipéptidos por medio de un cribado. Un método o cribado adecuado para identificar péptidos u otras moléculas que se unen selectivamente a una proteína diana puede comprender poner en contacto la proteína diana con un péptido de ensayo u otra molécula en condiciones en las que pueda producirse la unión, y después determinar si la molécula o péptido de ensayo se ha unido a la proteína o péptido diana. Son bien conocidos en el estado de la técnica métodos de detección de la unión entre dos restos.

20 Preferiblemente, el resto de unión puede ser una molécula polipeptídica (tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un aptámero de ácido nucleico, entre otros. Las moléculas de unión usadas más frecuentemente son anticuerpos.

25 Por "anticuerpo" se entiende un anticuerpo completo, incluyendo sin limitación un anticuerpo quimérico, recombinante, transgénico, humanizado, injertado y de cadena sencilla y similares, o cualquier proteína de fusión, conjugados, fragmentos o derivados del mismo que contienen uno o más dominios que se unen selectivamente a la proteína o péptido diana. Por lo tanto, el término "anticuerpo" incluye una molécula de inmunoglobulina completa, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un fragmento inmunológicamente eficaz de cualquiera de estos. Un fragmento de anticuerpo significa un fragmento Fv, un Fv ligado por disulfuro, scFv, Fab, Fab' o F(ab')₂, que son bien conocidos en la técnica, o cualquier parte del anticuerpo con un tamaño y una conformación adecuadas para unirse a la proteína o péptido diana. Existen diversas ventajas para el uso de fragmentos de anticuerpo en lugar de anticuerpos completos.

30 Los anticuerpos monoclonales (MAb) son anticuerpos monoespecíficos. Dada (casi) cualquier sustancia, es posible generar anticuerpos monoclonales que se unan específicamente a esa sustancia. Pueden producirse Mab por técnicas que son bien conocidas en el estado de la técnica.

35 Se emplean frecuentemente anticuerpos para la determinación de la expresión de una proteína particular en el interior de una célula mediante técnicas inmunohistoquímicas o inmunofluorescentes. Preferiblemente, la técnica a usar en la presente invención es la inmunohistoquímica (IHC). La IHC es una técnica bien conocida que se usa ampliamente para entender la distribución y la localización de biomarcadores y proteínas expresadas de forma diferencial en diferentes partes de un tejido biológico.

Ejemplos

Materiales y métodos

Células y tejidos humanos de metástasis cerebral

45 Los cultivos celulares MDA-MB 435 (435-P) y las células 435-Br1 son modelos humanos bien caracterizados (proporcionados por Àngels Fabra de IDIBELL), establecidos a partir de metástasis cerebral en ratones atímicos con capacidad para metastatizar en el cerebro (Schackert G. et al., "Unique patterns of brain metastasis produced by different human carcinomas in athymic nude mice", *Int. J. Cancer*, 1989, vol. 44, vol. 892-897; Zhang R. D. et al., "Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis", *Invasion Metastasis*, 1991, vol. 11, págs. 204-215). Estos cultivos celulares se mantuvieron en una mezcla 1:1 (v/v) de medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 de Ham complementado con suero fetal bovino al 10%, piruvato 1 mmol/l y L-glutamina 2 mmol/l en CO₂ al 5%-aire al 95%, a 37°C en un incubador humidificado.

50 Para estudios funcionales también se usaron otras variantes metastásicas procedentes de cultivos primarios de metástasis de hígado (435-Liver) y pulmón (435-Lung) (Martin B. et al., "Functional Clustering of Metastasis Proteins Describes Plastic Adaptation Resources of Breast-Cancer Cells to New Microenvironments", *J. Proteome Res.*, 2008, vol. 7, págs. 3242-3253). En algunos experimentos se usaron células metastásicas de hueso de MDA-MB 231, células BO2 proporcionadas por P. Clézardin (INSERM U.664, Faculté de Médecine Laennec, Lyon, Francia).

Para confirmar la expresión de proteína se usaron seis metástasis cerebrales, emparejadas con los correspondientes carcinomas ductales de mama, de pacientes tratados quirúrgicamente en el Hospital Universitario de Bellvitge, HUB.

También se usaron carcinomas ductales de mama primarios en el diagnóstico inicial para evaluar el valor predictivo de cada proteína. El Comité para el Cáncer de Mama del Instituto Catalán de Oncología (I.C.O.) y el HUB suministraron muestras de pacientes diagnosticados entre 1988 y 2006. La serie incluía 71 tumores consecutivos en el diagnóstico inicial de pacientes metastásicos, con uno o varios órganos afectados, y 51 pacientes con ganglios linfáticos positivos en la cirugía sin evolución metastásica después de un seguimiento mínimo de cinco años. Para optimizar cada análisis inmunohistoquímico, también se usaron tejidos de control de cáncer de mama (GRP94, TRAF2), testículo (inhibina), riñón y corazón (FN14) (Véase la Tabla 1 de más abajo).

Identificación de candidatos de cáncer

El procedimiento para identificar nuevos candidatos de cáncer ha sido descrito por Aragües y colaboradores (Aragües R. et al., "Predicting cancer involvement of genes from heterogeneous data", *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9, pág. 172). En una primera etapa, se construyó una red de interacciones proteína-proteína ("PPIN") a partir de un conjunto de proteínas diana que se sabe que están implicadas en el cáncer (es decir, proteínas semilla). Después, se cartografiaron los niveles de expresión génica sobre las proteínas de la red. Se considera que una proteína se expresa de forma diferencial si el gen que la codifica era expresado de forma diferencial en el experimento de micromatrices. Por último, se produjo una lista de genes de cáncer candidatos.

Para clasificar las proteínas por su función se usó el programa informático FatiGo; una herramienta web para detectar asociaciones significativas entre términos de ontología de genes y grupos de genes (Al-Shahrour F. et al., "FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes", *Bioinformatics*, 2004, vol. 20, págs. 578-580).

Análisis proteómico experimental y análisis de la red de interacciones de proteínas

Se usó antes del análisis proteómico que comparaba la expresión diferencial de proteínas entre células 435-P y 435-Br1, para generar y analizar una red de interacciones proteína-proteína (Martin B. et al., "Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells", *J. Proteome Res.*, vol. 7, págs. 908-920). En resumen, se identificaron las proteínas que se expresaban de forma diferencial mediante electroforesis bidimensional en gel (EttanTM DIGE, Amersham Biosciences AB) en células 435-Br1 mediante espectros de masas de huella peptídica registrados mediante un Voyager STR MALDI-TOF (Applied Biosystems) en modo reflector positivo con extracción retardada. Los espectros se analizaron usando el programa m/z (Proteometrics, Nueva York, NY). Las proteínas se identificaron frente a una base de datos no redundante (NCBI) usando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

La red de proteínas se basaba en 17 proteínas conocidas. Se usó PIANA (Aragües R. et al., "PIANA: protein interactions and network analysis", *Bioinformatics*, 2006, vol. 22, págs. 1015-1017) para combinar los datos de DIP 2006.01.16, (Salwinski L. et al., "The Database of Interacting Proteins: 2004 update", *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, págs. D449-451), MIPS 2006.01 (Pagel P. et al., "The MIPS mammalian protein-protein interaction database", *Bioinformatics*, 2005, vol. 21, págs. 832-834), HPRD 2005.09.13 (Peri S. et al., "Human protein reference database as a discovery resource for proteomics", *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, págs. D497-501), BIND 2006.01 (Alfarano C. et al., "The Biomolecular Interaction Network Database and related tools 2005 update", *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 33, págs. D418-424) y las interacciones humanas de dos experimentos de alto rendimiento (Rual J. F. et al., "Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network", *Nature*, 2005, vol. 437, págs. 1173-1178; Stelzl U. et al., "A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome", *Cell*, 2005, vol. 122, págs. 957-968).

La integración de muchas fuentes de interacciones diferentes en un único dispositivo de almacenamiento permitió trabajar con un vasto conjunto de 363.571 interacciones entre 42.040 secuencias de proteínas diferentes. El conjunto inicial de proteínas se denominó "proteínas semilla". En esta red, una proteína que estaba asociada con más de un semilla se denominó un N-conector, siendo N el número de proteínas semilla con las que estaba asociada.

Por último, las proteínas que sólo estaban asociadas con una proteína semilla se denominaron "hojas" (Dawelbait G. et al., "Structural templates predict novel protein interactions and targets from pancreas tumour gene expression data", *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, págs. i115-124; Cockell S. J. et al., "Structure-based evaluation of in silico predictions of protein-protein interactions using Comparative Docking", *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, págs. 573-581).

Datos transcriptómicos de metástasis cerebral en seres humanos

Se usó la lista de genes expresados de forma diferencial para 4 metástasis cerebrales de pacientes con cáncer de mama obtenida del MetaBre Consortium. Se analizaron mediante hibridación con micromatrices usando el GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, UK Ltd, Reino Unido), que incluye más de 47.000 transcritos y variantes, siguiendo protocolos convencionales para la extracción de ARN y preparación de las sondas. Para

procesar y normalizar los chips de Affymetrix se usaron algoritmos de promedio robusto de multichip (RMA) (Irizarry R. A. et al., "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data", *Biostatistics*, 2003, vol. 4, págs. 249-264). Todos estos cálculos se realizaron con el paquete Bioconductor (Gentleman R. C. et al., "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics", *Genome Biol.*, 2004, vol. 5, pág. R80). Los perfiles de expresión se analizaron con BRB Array Tools, versión 3.3beta3 (Biometric Research Branch, Division of Cancer Treatment and Diagnosis Molecular Statistics and Bioinformatics Section, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Se usaron dos procedimientos diferentes para las comparaciones: (1) la variación en número de veces para cada gen en metástasis cerebral en comparación con una combinación de carcinomas de mama primarios (Lonnstedt I. et al., "Replicated microarray data", *Statistica Sinica*, 2002, vol. 12, págs. 31-46); (2) y un test t univariante (Landemaine T. et al., "A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis", *Cancer Res.*, vol. 68, págs. 6092-6099) para identificar genes que se expresaban de forma diferencial en metástasis cerebral y en metástasis en órganos distintos del cerebro (5 muestras de metástasis de pulmón, 6 de hígado, 2 de piel y 6 de hueso osteolítico).

También se usó para las comparaciones la lista obtenida en los mismos experimentos de genes expresados de forma diferencial en metástasis diferentes de la metástasis cerebral (genes en pulmón, hígado y hueso) con respecto a una combinación de tumores de cáncer de mama.

Micromatrices de tejidos (TMA) e inmunohistoquímica

Se prepararon TMA a partir de tres áreas representativas del tumor que se seleccionaron cuidadosamente a partir de secciones teñidas con hematoxilina-eosina de bloques de 122 donantes. Se troquelaron cilindros de núcleo de un diámetro de 0,6 mm de cada uno de ellos con un punzón de biopsia de piel y se depositaron en bloques de parafina receptores usando un dispositivo de generación de matrices específico (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI), tal y como se describe en Fernandez y colaboradores (Fernandez P. L., et al., "Tissue macroarrays ("microchops") for gene expression analysis", *Virchows Arch.*, 2001, vol. 438, págs. 591-594). Además de tumores, el bloque receptor también contenía 6 muestras normales de mama. Se realizaron secciones de 3 μ m del bloque de micromatriz resultante y se usaron para análisis de IHC después de transferirse a portaobjetos de vidrio.

Las condiciones experimentales y las características y fuente de los anticuerpos usados se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1

VALIDACIÓN IHC	Anticuerpo	Clon y empresa	Protocolos	Expresión celular	Tejido de control
PROTEÓMICA DE CEREBRO	GRP 94	sc-1794 (C-19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)	1/2000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Retículo endoplásmico	Carcinoma de mama
	TRAF2	SM7106P (clon 33A1293; 205-222 aa) (Acris, Acris Antibodies GmbH, Alemania)	1/100 una noche (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Carcinoma de mama
	FN14	sc-27143 (C-13) (Santa Cruz Biotechnology)	1/3000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Membrana	Riñón/corazón
IDENTIFICACIÓN MetaBre CEREBRO	INHA	MCA951ST (R1) (abD serotec; una División de Morphosys, Alemania)	1/50 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Testículo
	TOP1	ab3825 (401-600 aa) (Abcam; Abcam plc, Reino Unido)	1/100 (recuperado en TRIS/EDTA)	Núcleos/citoplasma	Tumor colorrectal
	VAV2	sc-20803 (H-200) (Santa Cruz Biotechnology)	1/1000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Páncreas
OTRAS VALIDACIONES	GFAP	Z0334 (Dakocytomation, Dako Diagnostics S.A, Dinamarca)	1/8000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Cerebro (astrocitos)
	TEM 8	ab21270 (Abcam)	1/2000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma/membrana	Endotelio de tumor cerebral
	ARFGAP	SP1402P (Acris)	1/1000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Testículo
	EIF3s8	ab19359 (1-50 aa N-terminales) (Abcam)	1/1000 una noche (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Riñón
	BAT 8	G-6919 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)	1/250 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Ganglio linfático

Se usaron tejidos de control positivos para cada proteína como una referencia para la intensidad de tinción de TMA.

- 5 Los antígenos se recuperaron por calentamiento en una olla de presión durante 20 minutos en el tampón apropiado (como se indicaba en la Tabla 1 anterior). Se diluyeron anticuerpos primarios en tampón diluyente de anticuerpos Dako Real™ (Dakocytomation): tampón Tris, pH 7,2, NaN₃ 15 mM. Se usó LSAB+System-HRP (Dakocytomation) incluyendo las inmunoglobulinas biotiniladas anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra en PBS; estreptavidina conjugada con HRP en PBS; y 3,3'-diaminobencidina líquida en solución de cromógeno. Se usó el anticuerpo policlonal anti-HERB-2, A0485 (DAKO) con el kit de detección Ultraview en un sistema de tinción automático (Benchmark XT, Estados Unidos).
- 10

Las inmunorreactividades se clasificaron estimando el porcentaje de células tumorales que mostraron una tinción

característica (desde “indetectable” o del 0%, hasta tinción homogénea o del 100%) y estimando la intensidad de tinción (1, tinción débil o negativa; 2, tinción moderada; ó 3, tinción fuerte). Los valores límite eran los mismos para todos los marcadores ensayados: la tinción fuerte con más del 50% de las células que expresaban se consideró como positiva (FIG. 2) (Ginestier C. et al., “Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA microarrays in the study of breast tumor markers”, *Am. J. Pathol.*, vol. 161, págs. 1223-1233; Jacquemier J. et al., “Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis”, *Cancer Res.*, 2005, vol. 65, págs. 767-779). Se comprobó la reproducibilidad del método usando múltiples intérpretes y la fiabilidad por comparación con inmunohistoquímica convencional en secciones completas. Los portaobjetos fueron evaluados al microscopio óptico por dos investigadores.

10 Análisis de transferencia de Western (WB)

Se lisaron células de cultivos en fase exponencial en 200 µl de tampón RIPA. Las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida al 7% o 12% se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-p, Millipore Corporation, Bedford, MA). Se usaron los siguientes anticuerpos: GRP94, clon C-19 (Santa Cruz) a 1/1000; GRP78, clon N-20 (Santa Cruz) a 1/500; HSP70, clon C92F3A-5 a 1/1000 (Stressgen, Ann Arbor, MI); GRP58, producto E1031 a 1/200 (Sigma), HSP60, clon LK1 (Abcam) a 1/200; TRAF2, clon 33A1293 a 1/100 (Acris Antibodies, GmbH, Alemania); ATF6, clon 70B14B.1 a 1/200 (Acris). También se usaron anticuerpo monoclonal anti-actina humana 1/2000 (Sigma) y anti-tubulina α humana, clon B-5-1-2 (Sigma) a 1/10.000 como patrones internos para el análisis densitométrico, para los que se midió una banda usando el programa Quantity One; la intensidad de una banda se calcula como la suma de las intensidades de todos los píxeles dentro de los límites de la banda multiplicada por el área de cada píxel.

Se usó anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa 1/2000 (Amersham), o anticuerpo secundario anti-ratón 1/2000 (Pierce, Perbio Science Ltd., Cheshire, Reino Unido) o anticuerpo secundario anti-cabra 1/3000 (Santa Cruz) según fuera apropiado en cada caso.

Se visualizaron las bandas inmunorreactivas con un sistema de formación de imágenes VersaDoc™ (Bio-Rad) usando el Super Signal west-Pico (Pierce). Se establecieron los PM con la referencia preteñida de See Blue Plus2 (Invitrogen, San Diego, CA).

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se siguieron las sugerencias de STARTD (<http://www.stard-statement.org/>). Se usó un análisis de varianza de dos vías para comparar los niveles medios de expresión. Los marcadores de inmunohistoquímica se clasificaron en una escala de tres categorías (negativo, positivo débil y positivo fuerte). La predictibilidad de metástasis cerebral para cada marcador se ensayó usando una prueba exacta de Fisher bilateral y se resumió por cálculo de la sensibilidad entre tumores que desarrollaron metástasis y la especificidad entre tumores sin metástasis para valores positivos fuertes (los que tienen más de 50% de células positivas). También se calcularon las relaciones de probabilidad positiva y negativa como índices predictivos integrados, así como el área bajo la curva de ROC. Se evaluaron los marcadores usando un modelo de regresión logística multivariante en un procedimiento por pasos hacia delante para identificar la mejor combinación para predecir la metástasis cerebral. Puesto que HERB-2 ya era un factor de riesgo de metástasis conocido, también se realizó un análisis que incluía HERB-2 como la medida basal, así como un análisis estratificado de cada marcador candidato dentro de tumores positivos y negativos para HERB-2. En todos los análisis, las asociaciones se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

a) Red de interacciones proteína-proteína (PPIN) experimental validada con transcriptómica de metástasis cerebral

Los autores de la invención usaron un planteamiento integrado para construir, ensayar y perfeccionar un modelo de rutas celulares implicadas en la evolución de la metástasis cerebral usando una PPIN. Se usó una PPIN de metástasis cerebral obtenida previamente (consúltese Martin B. et al., “Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells”, *J. Proteome Res.*, 2008, vol. 7, págs. 908-920) que incluía 628 proteínas de 13 semillas conocidas identificadas mediante MALDI-TOF. 8 proteínas eran expresadas en defecto en células metastásicas cerebrales con respecto a las células parentales (glioxalasa 1, queratina 1, proteína de choque térmico 27 (HSP27) y 70 (HSP70), galectina 1, isoforma 3 de corte y empalme de RAD 50, proteína ribosomal 40s s12 y catepsina D) y 5 eran expresadas en exceso (receptor de laminina de 34/67 kDa (34/67-LMR), queratina 10, vimentina, cadena β de ATP sintasa y tubulina β5).

La PPIN se comparó con 5.235 genes de metástasis cerebral expresados de forma diferencial con respecto a una combinación de carcinomas de mama primarios de transcriptómica (variación en número de veces, ≥ 2 , o ≤ -2). Usando este método (consúltese Lonnstedt I. et al., “Replicated microarray data”, *Statistica Sinica*, 2002, vol. 12, págs. 31-46), se encontraron en la red 556 parejas de proteína-gen que se correspondían con 183 genes diferentes, 48 expresados en defecto y 135 expresados en exceso (no se muestran los datos) (29,14% proteínas por ordenador).

Para clasificar de forma funcional esta identificación de proteínas cerebrales se usó el programa informático FatiGO que a través de ID Ensembl busca términos GO para llegar a una función preponderante de proteínas estadísticamente significativas en grupos de coexpresión. Se clasificaron 112 códigos de términos GO: 34 metabolismos de ácidos nucleicos (36,17%), 29 proteínas de traducción (30,85%), 18 proteínas involucradas en las modificaciones y plegamientos de otras proteínas (19,15%), 9 de muertes celulares (9,58%) y una miscelánea de proteínas de señalización y transporte metabólico (no se muestran los datos).

b) Identificación funcional específica de órgano de metástasis cerebral

La identificación de genes cerebrales se catalogó como la identificación de metástasis específica del cerebro (BMOS) con un agrupamiento jerárquico que distingue claramente entre las diferentes metástasis (véase, Landemaine T. *et al.*, "A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis", *Cancer Res.*, 2008, vol. 68, págs. 6092-6099). La BMOS contenía 1.193 genes (MetaBre) después de que las comparaciones de clase de uno contra todos (ONA) identificaran genes expresados de forma diferencial en las 4 metástasis cerebrales a diferencia de en las otras 19: 6 de hueso, 5 de pulmón, 2 de piel y 6 de hígado.

Integrando los análisis genómicos y proteómicos que se han descrito anteriormente, los autores de la invención relacionaron la BMOS con la red de proteínas obtenida en la sección anterior y obtuvieron 38 proteínas específicas de cerebro: 7 expresadas en defecto y 31 expresadas en exceso. Estas incluían 13 proteínas del metabolismo de ácidos nucleicos (48,15%), 10 proteínas de traducción (37,04%), 7 proteínas de muerte celular (25,93%), 6 proteínas que modifican y plegamiento de proteínas (22,22%) así como miscelánea de proteínas implicadas en metabolismo, transporte y señalización, algunas de ellas con varias funciones. Estas proteínas clasificadas adicionalmente con el programa informático FatiGO se validaron como una identidad funcional específica de órgano con un ligero aumento en genes de muerte celular.

Además, eran predominantes cinco funciones de la PPIN: unión y reparación de ADN; plegamiento de proteínas y chaperonas, que implican una proteína más de unión a ADN (014776); estructural de citoesqueleto, que implica cuatro nuevas proteínas de unión a ADN (Q9POW2, P33991, Q53X93, Q9UJN0), dos nuevos factores de transducción de señales (P50453, P16220), una proteína de ubiquitinización (Q96BH1), una proteína del metabolismo de aminoácidos (Q8N6T7) y una proteína implicada en la metilación (Q96KQ7); biosíntesis de proteínas, que implica cuatro nuevos factores de transducción de señales (P29692, Q96I38, Q8IWK1, P05111); y una proteína de transporte de vesículas (Q8N6T3).

Los autores de la invención buscaron referencias a identificaciones de metástasis cerebral en datos genómicos publicados de cáncer de mama clínico y experimental y análisis de metástasis, pero no encontraron ninguna. De la lista de genes, sólo siete aparecían en listas anteriores de generación de perfiles de expresión génica que predecían desenlaces clínicos del cáncer de mama: EEF1D, MCM4, RPL5, RPS12 y CLN3, a partir de la generación de perfiles de expresión génica que predicen el desenlace clínico (véase van 't Veer *et al.*, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer", *Nature*, 2002, vol. 415, págs. 530-536) y FAM3A y TBCD a partir de las identificaciones de expresión génica en la predicción del desenlace del cáncer de mama (véase, Nevins J. R. *et al.*, "Towards integrated clinico-genomic models for personalized medicine: combining gene expression signatures and clinical factors in breast cancer outcomes prediction", *Hum. Mol. Genet.*, 2003, vol. 12 Espec. N° 2: R153-157). La GFAP, una proteína ubicua en el SNC, también aparecía en una lista de genes que eran expresados de forma diferencial entre metástasis del cáncer de mama en cerebro y hueso (véase, Klein A. *et al.*, "Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes", 2008, *Cancer Lett.*, (Electronic)).

Se llevaron a cabo experimentos inmunohistoquímicos adicionales en las seis muestras de metástasis cerebral tumoral de cáncer de mama emparejadas de pacientes para corroborar la expresión diferencial de algunas proteínas representativas de las funciones implicadas. Se validó la expresión de GRP94, el plegamiento de proteínas y chaperonas, en todas las parejas (6/6) con una intensidad de tinción citoplasmática similar; FN14, de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral conectaba con el plegamiento de proteínas y nudo de chaperonas, que tenía una tinción de membrana particular y citoplasmática aumentada en la metástasis cerebral (6/6); y TRAF2, una proteína adaptadora y transductora de señales que relaciona miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral con diferentes rutas de señalización que presentaban una clara tinción citoplasmática.

Para validar el carácter específico de órgano de esta identificación, los autores de la invención volvieron a los datos transcriptómicos para comprobar la expresión en metástasis distintas del cerebro (hígado, pulmón y hueso) de genes que se sabe que están implicados en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (ERS). Así, se buscaron grupos funcionales diferentes de genes: chaperonas del retículo endoplásmico, sensores de estrés clásico, respuesta de plegamiento/no plegamiento de proteínas, rutas de señalización clásicas, resistencia a estrés oxidativo, proteosoma, transportadores de glucosa, grupos del metabolismo de aminoácidos, transportadores de proteínas y receptores y transductores de señales. De estos, los expresados en exceso de una forma más diferencial eran la proteína GRP94, 10 veces, en metástasis cerebral pero también en pulmón, 6,5 veces y hueso, 3,3 veces; HSP90, 22 veces, en cerebro seguido de hueso, 7,5 veces; calreticulina, 8 veces, que muestra un ligero aumento en hueso y pulmón. Más específicamente, en el cerebro la subunidad del proteosoma 26S se expresaba en exceso 12 veces, el receptor de proteína tirosina quinasa HERB-2 32 veces y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 9,5 veces. Por el contrario, otras funciones no tenían una expresión importante en el cerebro, por ejemplo, el metabolismo de

glucosa se expresaba en exceso solamente en hígado, o el metabolismo de aminoácidos. Por lo tanto, de acuerdo con la expresión de estos genes en las cuatro metástasis diferentes, los autores de la invención formularon la hipótesis de que la metástasis cerebral tenía un fenotipo funcional particular diferente de otras metástasis que se desarrollan en pulmón, hígado o hueso.

De las proteínas validadas, las implicadas en el plegamiento de proteínas y chaperonas pueden relacionar diferentes funciones y presumiblemente actúan rescatando células de respuestas de RES. De hecho, el mecanismo integrado implica las respuestas de proteínas no plegadas (UPR) para establecer un eje de comunicación entre el retículo endoplásmico (RE) y el núcleo, la maquinaria de degradación asociada al RE, la maquinaria exportación del RE y una interfaz con mitocondrias implicada en la activación de mecanismos proapoptóticos. GRP94, la glicoproteína más abundante en el RE, está implicada en la maduración conformacional de proteínas destinadas a presentación en la superficie celular o exportación. GRP94, como BiP, podría participar en la activación de PERK, ATF6 e IRE1 por ERSRP. Por lo tanto, el exceso de expresión de GRP94 en metástasis cerebral podría ser un eje que organiza el fenotipo ERSRP.

La apoptosis puede inducirse mediante IRE1 y TRAF2 por liberación de calcio de los depósitos del RE. Además, el exceso de expresión de FN14 a través de la señalización de TRAF2, como receptores de $TNF\alpha$, podría ser un mediador potencial de la supervivencia celular puesto que la activación induce la translocación desde el citoplasma hasta el núcleo, regulando por aumento proteínas antiapoptóticas. Por lo tanto, la capacidad de células metastásicas cerebrales de manejar el estrés puede condicionar su capacidad intrínseca para sobrevivir y contribuir a la evolución a metástasis cerebral y a la resistencia a terapia. Puesto que GRP94 también era una molécula de metástasis cerebral específica de órgano en muestras de pacientes, los autores de la invención formularon la hipótesis de que GRP94 podía organizar las respuestas al estrés del retículo endoplásmico (ERSR), induciendo rutas compensatorias para inhibir la muerte celular.

c) La expresión de ERSRP en tumores primarios de cáncer de mama predice la evolución a metástasis cerebral

Para estimar la probabilidad de desenlaces específicos de metástasis cerebral se analizó el ERSRP generado en una serie de tumores de cáncer de mama primarios para determinar su valor como una supuesta herramienta para la predicción temprana en el diagnóstico inicial.

Se seleccionó la tecnología de matrices de tejidos (TMA) porque permite el análisis simultáneo de muchas muestras de tumores archivadas organizadas en matrices sobre portaobjetos de vidrio mediante análisis inmunohistoquímico tradicional sobre tejidos embebidos en parafina con un seguimiento prolongado. La TMA permitió comprobar la expresión de GRP94, TRAF2 y FN14 seleccionados del análisis proteómico en tumores de mama primarios. También se comprobó VAV2, TOP1 e Inhibina, que obtuvieron buenas puntuaciones como específicos de órgano cerebral en los datos transcriptómicos previos y se validaron adicionalmente mediante IHC a nivel de expresión de proteínas. Los resultados se resumen en la Tabla 2:

Tabla 2

MARCADORES DE METÁSTASIS CEREBRAL					
	Sensibilidad	Especificidad	LR		Prueba exacta de Fisher (bilateral)
			(+)	(-)	
ErbB2	8/13 (61,5)	90/99 (90,9)	6,70	0,42	< 0,0001
GRP94	12/13 (92,0)	55/107 (51,4)	1,89	0,16	0,003
FN14	9/13 (69,2)	70/104 (77,0)	3,01	0,40	0,001
TRAF2	9/11 (81,8)	45/88 (51,1)	1,67	0,35	0,055
VAV2	2/13 (15,4)	95/107 (88,8)	1,38	0,95	0,65
TOP1	4/13 (30,8)	91/105 (86,6)	2,30	0,80	0,11
Inhibina	0/13 (0)	97/107 (90,7)	0	1,10	0,60

La expresión se optimizó y puntuó previamente para las seis parejas de tumores de cáncer de mama y metástasis cerebral emparejadas (FIG. 1). Como se esperaba, la tinción para todos los anticuerpos fue homogénea con diferentes intensidades entre ellos. Se consideró que un marcador era positivo cuando se detectaba una expresión alta, para evitar falsos positivos innecesarios, teniendo en cuenta la expresión conocida en un tejido de control (FIG. 2).

El análisis estadístico de los datos mostró asociaciones significativas entre la evolución a metástasis cerebral y la expresión alta de GRP94 ($p < 0,0001$), TRAF2 ($p < 0,001$), FN14 ($p < 0,0001$), TOP1 ($p=0,032$), y VAV2 ($p=0,005$). La expresión de Inhibina no se asoció con evolución a metástasis cerebral ($p = 0,2$). Como se esperaba, la expresión de HERB-2 se asociaba con metástasis cerebral con una alta significación ($p < 0,0001$); así como con la ausencia de receptores de hormonas, ER: 54,6% frente a 29,6% (6/11 y 29/98, respectivamente, $p = 0,016$) y PR: 72,7% frente al 39,0% (8/11 frente a 37/95, respectivamente, $p = 0,009$). También se observó una ligera asociación con el grado histológico (HG), HG III 46,9% (7/12 frente a 45/96, $p = 0,105$).

Se calcularon las relaciones de probabilidad positiva y negativa para evaluar la exactitud predictiva de cada molécula como un marcador de metástasis cerebral considerando la sensibilidad y la especificidad de cada una. El mayor valor predictivo para la presencia de la enfermedad metastásica fue la expresión de HERB-2 (LR positiva 6,7, $p < 0,0001$), seguido de FN14 (LR positiva 3,01, $p < 0,001$), GRP94 (LR positiva 1,89 $p < 0,003$) y TRAF2 (LR positiva 1,67, $p < 0,055$). Además, GRP94 fue el mejor marcador predictivo negativo (LR negativa 0,16), seguido de TRAF2 (LR negativa 0,35), FN14 (LR negativa 0,40) y HERB-2 (LR negativa 0,42). Por lo tanto, la ausencia de ERSRP en tumores predecía la ausencia de metástasis cerebral.

Un análisis multivariante basado en una regresión logística por pasos determinó GRP94, FN14 e inhibina como la mejor combinación para predecir la metástasis cerebral. El área bajo la curva de ROC para esta combinación fue de 0,85 (95% CI 0,75-0,96) mientras que el área bajo la curva de ROC para HERB-2 solo fue de 0,76 (95% CI 0,58-0,93). Esta combinación de marcadores supone una mejora significativa sobre la eficacia de predicción de HERB-2 ($p < 0,001$). (Tabla 3, FIG. 3)

También se realizó un análisis estratificado para comprobar la relación entre la positividad de HERB-2 y ERSRP en combinaciones binarias, como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3

Marcadores de metástasis cerebral de la invención	HERB-2 +			HERB-2 -		
	Sensibilidad	LR +	χ^2	Especificidad	LR -	χ^2
GRP 94	8/8 (100)	2,78	0,16	48/89 (53,9)	2,31	0,14
FN 14	5/8 (62,5)	1,47	0,23	68/88 (77,3)	6,88	0,004
TRAF 2	6/7 (85,7)	0,54	0,46	36/71 (50,7)	1,06	0,27
Marcadores tradicionales						
ER	3/7 (42,9)	0,54	0,46	21/83 (25,3)	1,06	0,27
PR	2/7 (28,6)	0,43	0,56	29/81 (35,8)	2,43	0,11
HG III	6/8 (75,0)	0,14	0,71	42/45 (93,3)	0,77	0,39

En tumores negativos para HERB-2, FN14 tenía una relación de probabilidad negativa alta para predecir la ausencia de evolución a metástasis cerebral (LR = 0,26, sensibilidad = 0,8, $p = 0,015$). Además, si el mejor predictor de metástasis cerebral solo era HER2, la adición de la expresión de GRP94, TRAF2 y FN14 aumentaba significativamente la predicción de enfermedad metastásica en cerebro. Además, la combinación de GRP94, FN14, Inhibina y HERB-2 mostró una predicción de enfermedad metastásica en el cerebro de aROC = 0,90.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral en un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor de mama, comprendiendo el método: (a) determinar el nivel de expresión de GRP94 en una muestra aislada del tumor de mama; y (b) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control, en donde si se detecta un exceso de expresión de dicho gen en relación con la muestra de control, es indicativo del riesgo de desarrollar metástasis cerebral.
2. El método según la reivindicación 1, que además comprende: (determinar el nivel de expresión de FN14 en una muestra aislada del tumor de mama; y (b) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de FN14 en una muestra de control, en donde si se detecta un exceso de expresión de dicho gen en relación con la muestra de control, es indicativo del riesgo de desarrollar metástasis cerebral.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además determinar el nivel de expresión de TRAF-2.
4. método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además determinar el nivel de expresión de HERB-2.
5. método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además determinar el nivel de expresión de inhibina.
6. método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se determina el nivel de expresión de uno de los siguientes conjuntos de marcadores:
(a) GRP94, FN14, inhibina;
(b) GRP94, TRAF2, HERB-2, y FN14;
(c) GRP94, FN14, inhibina y HERB-2; y
(d) GRP94, FN14 y TRAF2.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde se determina la cantidad de proteína.
8. El método según la reivindicación 7, en donde la cantidad de proteína se determina usando un anticuerpo que se une específicamente a dicha proteína.
9. Kit para llevar a cabo el método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, consistiendo el kit en medios adecuados para determinar el nivel de expresión de uno o más de los siguientes conjuntos de marcadores:
(a) GRP94 y FN14;
(b) GRP94, FN14 e inhibina;
(c) GRP94, TRAF2, HERB2 y FN14;
(d) GRP94, FN14, inhibina y HERB-2; y
(e) GRP94, FN14 y TRAF2,
en donde dichos medios adecuados son moléculas capaces de unirse específicamente a la proteína codificada por cada uno de dichos genes, en donde dichas moléculas se seleccionan de anticuerpos o fragmentos de los mismos y ácidos nucleicos aptámeros.

FIG. 1

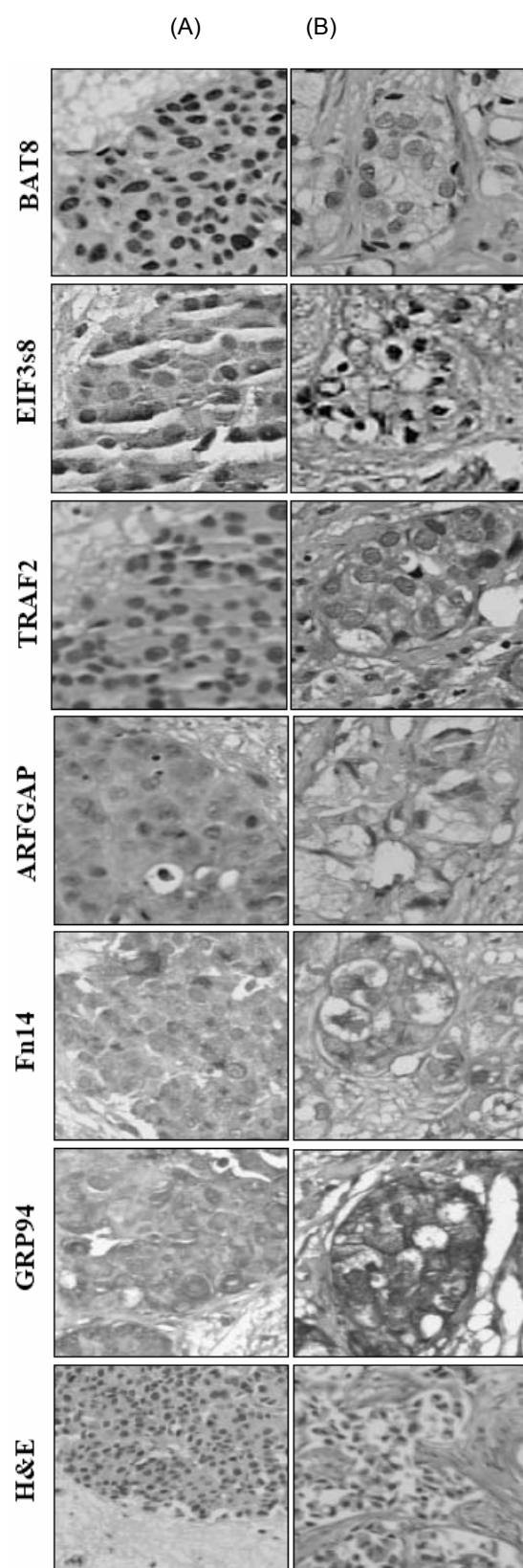


FIG. 2

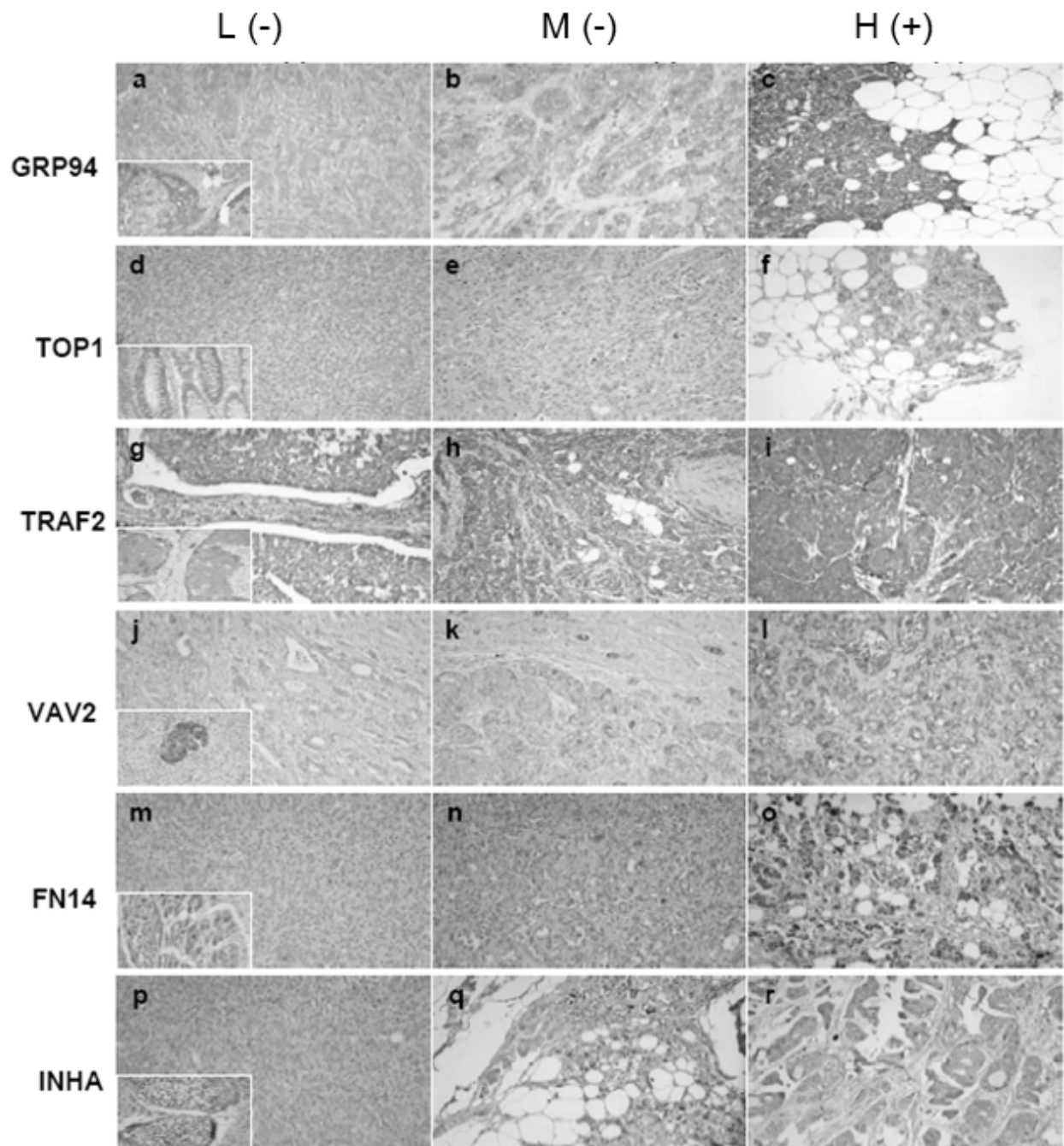


FIG. 3

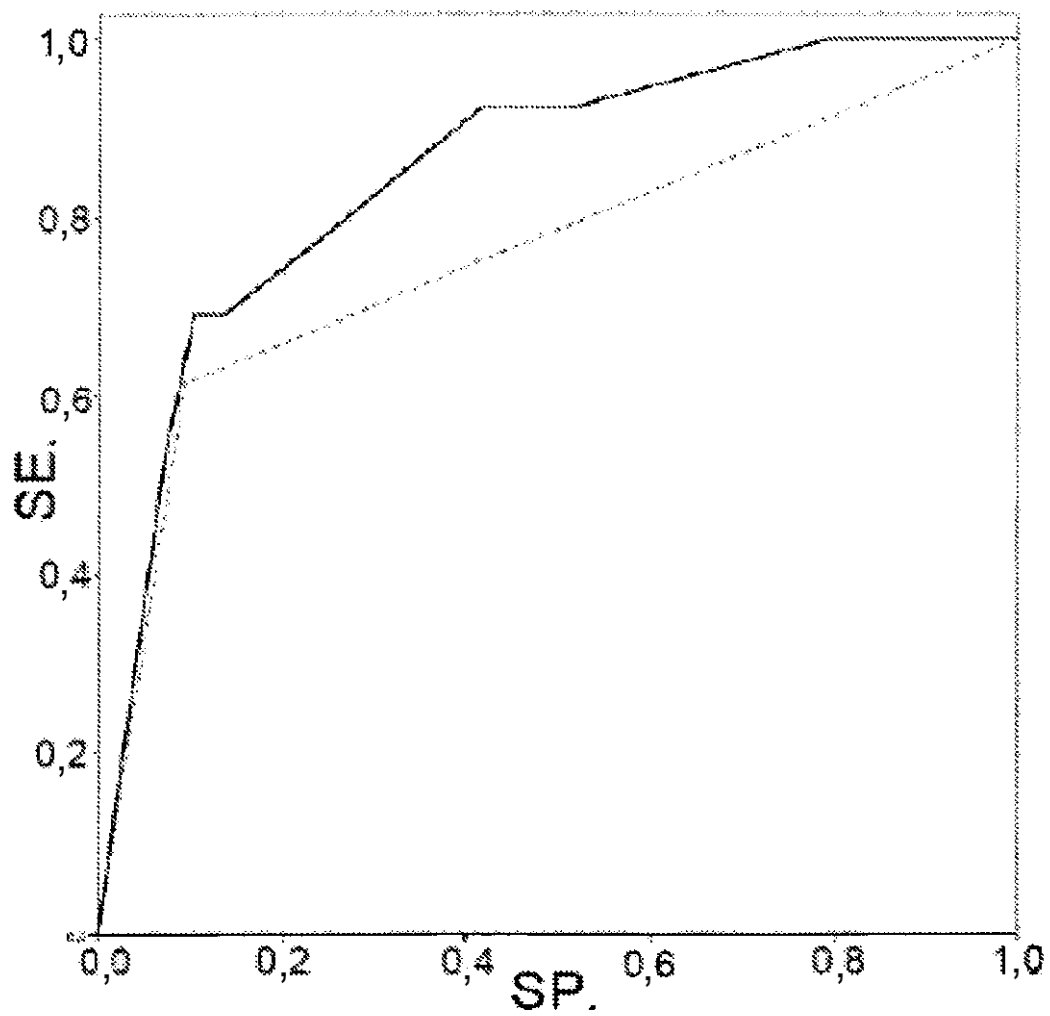


FIG. 4**P14625 (ENPL_HUMANO)**

10	20	30	40	50	60
MRALWVLGLC	CVLLTFGSVR	ADDEVVDVGT	VEEDLGKSRE	GSRTDDEVVQ	REEEAIQLDG
70	80	90	100	110	120
LNASQIRELR	EKSEKFAFQA	EVNRMMKLII	NSLYKNKEIF	LRELISNASD	ALDKIRLISL
130	140	150	160	170	180
TDENALSGNE	ELTVKIKCDK	EKNLLHVTDT	GVGMTREELV	KNLGTIAKSG	TSEFLNKMTE
190	200	210	220	230	240
AQEDGQSTSE	LIGQFGVGFY	SAFLVADKVI	VTSKHNNDTQ	HIWESDSNEF	SVIADPRGNT
250	260	270	280	290	300
LGRGTTITLV	LKEEASDYLE	LDTIKNLVKK	YSQFINFPIY	VWSSKTETVE	EPMEEEEEAAK
310	320	330	340	350	360
EEKEESDDEA	AVEEEEEEEKK	PKTKKVEKTV	WDWELMNDIK	PIWQRPSKEV	EEDEYKAFYK
370	380	390	400	410	420
SFSKESDDPM	AYIHFTAEGE	VTFKSILFVP	TSAPRGLFDE	YGSKKSDYIK	LYVRRVFITD
430	440	450	460	470	480
DFHDMMPKYL	NFVKGVVDS	DLPLNVSRET	LQQHKLLKVI	RKKLVRKTL	MIKKIADDKY
490	500	510	520	530	540
NDTFWKEFGT	NIKLGVIEDH	SNRTRLAKLL	RFQSSHPTD	ITSLDQYVER	MKEKQDKIYF
550	560	570	580	590	600
MAGSSRKEAE	SSPFVERLLK	KGYEVIYLTE	PVDEYCIQAL	PEFDGKRFQN	VAKEGVKFDE
610	620	630	640	650	660
SEKTESREA	VEKEFEPLL	WMKDKALKDK	IEKAVVSQRL	TESPCALVAS	QYGWSGNMER
670	680	690	700	710	720
IMKAQAYQTG	KDISTNYIAS	QKKTFEINPR	HPLIRDMLRR	IKEDDDKTV	LDLAVVLFET
730	740	750	760	770	780
ATLRSGYLLP	DTKAYGDRIE	RMLRLSLNID	PDAKVEEEPE	EEPEETAEDT	TEDTEQDEDE
790	800				
EMDVGTDEEE	ETAKESTAEEK	DEL			

FIG. 5**Q9NP84 (TNR12_HUMANO)**

```

      10      20      30      40      50      60
MARGSLRRL RLLVLGLWLA LLRSVAGEQA PGTAPCSRGS SWSADLDKCM DCASCRARPH

      70      80      90     100     110     120
SDFCLGCAAA PPAPFRLLWP ILGGALSLTF VLGLLSGFLV WRRRCRRREKF TTPIEETGGE

```

GCPAVALIQ

FIG. 6**Q96NT2 (TRAF2_HUMANO)****Q12933**

```

      10      20      30      40      50      60
MAAASVTPPG SLELLQPGFS KTLLGTKLEA KYLCSACRNV LRRPFQAQCG HRYCSFCLAS

      70      80      90     100     110     120
ILSSGPQNCA ACVHEGIYEE GISILESSA FPDNAARREV ESLPAVCPSD GCTWKGTKE

      130     140     150     160     170     180
YESCHEGRCP LMLTECPACK GLVRLGEKER HLEHECPERS LSCRHCRAPC CGADVKAHHE

      190     200     210     220     230     240
VCPKFPLTCD GCGKKKIPRE KFQDHVKTCG KCRVPCRFA IGCLETVEGE KQQEHEVQWL

      250     260     270     280     290     300
REHLAMLLSS VLEAKPLLGD QSHAGSELLQ RCESLEKKTA TFENIVCVLN REVERVAMTA

      310     320     330     340     350     360
EACSRQHRLD QDKIEALSSK VQQLERSIGL KDLAMADLEQ KVLEMEASTY DGVFIWKISD

      370     380     390     400     410     420
FARKRQEAVA GRIPAIFSPA FYTSRYGYKM CLRIYLNLDG TGRGTHLSLF FVVMKGPNDA

      430     440     450     460     470     480
LLRWPFNQKV TLMLLDQNNR EHVIDAFRPD VTSSSFQRPV NDMNIASGCP LFCPVSKMEA

      490     500
KNSYVRDDAI FIKAIVDLTG L

```

FIG. 7**P04626 (ERBB2_HUMANO)**

10	20	30	40	50	60
MELAALCRWG	LLLALLPPGA	ASTQVCTGTD	MKLRLPASPE	THLDMLRHLY	QGCQVVGNL
70	80	90	100	110	120
ELTYLPTNAS	LSFLQDIQEV	QGYVLIAHNQ	VRQVPLQRLR	IVRGTQLFED	NYALAVLDNG
130	140	150	160	170	180
DPLNNTTPVT	GASPGGLREL	QLRSLTEILK	GGVLIQRNPQ	LCYQDTILWK	DIFHKNNQLA
190	200	210	220	230	240
LTLIDTNRSR	ACHPCSPMCK	GSRCWGESSE	DCQSLTRTVC	AGGCARCKGP	LPTDCCHEQC
250	260	270	280	290	300
AAGCTGPKHS	DCLACLHFNH	SGICELHCPA	LVTYNTDTFE	SMPNPEGRYT	FGASCVTACP
310	320	330	340	350	360
YNYLSTDVGS	CTLVCPLHNQ	EVTAEEDGTQR	CEKCSKPCAR	VCYGLGMEHL	REVRVTSAN
370	380	390	400	410	420
IQEFAGCKKI	FGSLAFLPES	FDGDPASNTA	PLQPEQLQVF	ETLEEITGYL	YISAWPDSLP
430	440	450	460	470	480
DLSVFQNLQV	IRGRILHNGA	YSLTLQGLGI	SWLGLRSLRE	LGSGLALIHH	NTHLCFVHTV
490	500	510	520	530	540
PWDQLFRNPH	QALLHTANRP	EDECVGEGLA	CHQLCARGHC	WGPAPTQCVN	CSQFLRGQEC
550	560	570	580	590	600
VEECRVLQGL	PREYVNARHC	LPCHPECQPQ	NGSVTCFGPE	ADQCVACAHY	KDPPFCVARC
610	620	630	640	650	660
PSGVKPDLSY	MPIWKFPDEE	GACQPCPINC	THSCVDLDDK	GCPAEQRASP	LTSIISAVVG
670	680	690	700	710	720
ILLVVVLGVV	FGILIKRRQQ	KIRKYTMRRRL	LQETELVEPL	TPSGAMPNQA	QMRILKETEL
730	740	750	760	770	780
RKVKVLGSGA	FGTVYKGIWI	PDGENVKIPV	AIKVLRENTS	PKANKEILDE	AYVMAGVGSP
790	800	810	820	830	840
YVSRLLGICL	TSTVQLVTQL	MPYGCLLDHV	RENRGRLGSQ	DLNWCQMIA	KGMSYLEDVR
850	860	870	880	890	900
LVHRDLAARN	VLVKSPNHVK	ITDFGLARLL	DIDETEHAD	GGKVPIKWMA	LESILRRRFT
910	920	930	940	950	960
HQSDVWSYGV	TVWELMTFGA	KPYDGIPARE	IPDLLEKGER	LPQPPICTID	VYMIMVKCWM
970	980	990	1000	1010	1020
IDSECRPRFR	ELVSEFSRMA	RDPQRFVVIQ	NEDLGPASPL	DSTFYRSLE	DDDMGDLVDA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
EEYLVPQQGF	FCPDPAAGAG	GMVHHRHRSS	STRSGGGDLT	LGLEPSEEEA	PRSPLAPSEG

1090	1100	1110	1120	1130	1140
AGSDVFDGDL	GMGAAKGLQS	LPTHDPSPLO	RYSEDPTVPL	PSETDGYVAP	LTCSPQPEYV
1150	1160	1170	1180	1190	1200
NQPDVRPQPP	SPREGPLPAA	RPAGATLERP	KTLSPGKNGV	VKDVFAGGGA	VENPEYLTPQ
1210	1220	1230	1240	1250	
GGAAPQPHPP	PAFSPAFDNL	YYWDQDPPER	GAPPSTFKGT	PTAENPEYLG	LDVPV

FIG. 8**P05111 (INHA_HUMANO)**

10	20	30	40	50	60
MVLHLLLFLL	LTPQGGHSCQ	GLELARELVL	AKVRALFLDA	LGPPAVTREG	GDPGVRRLPR
70	80	90	100	110	120
RHALGGFTHR	GSEPEEEEDV	SQAILFPATD	ASCEDKSAAR	GLAQEAEEGL	FRYMFRRPSQH
130	140	150	160	170	180
TRSRQVTSQA	LWFHTGLDRQ	GTAASNSSEP	LLGLLALSPG	GPVAVPMSLG	HAPPHWAVLH
190	200	210	220	230	240
LATSALSLLT	HPVLVLLLR	PLCTCSARPE	ATPFLVAHTR	TRPPSGGERA	RRSTPLMSWP
250	260	270	280	290	300
WSPSALRLQ	RPPEEPAAHA	NCHRVALNIS	FQELGWERWI	VYPPSFIFHY	CHGGCGLHIP
310	320	330	340	350	360
PNLSLPVPGA	PPTPAQPYSL	LPGAQPCCAA	LPGTMRPLHV	RTTSDGGYSF	KYETVPNLLT

QHCACI