



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 291**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99948349 .8**  
86 Fecha de presentación : **23.09.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1115426**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2001**

54 Título: **Método de diagnóstico, control, determinación del estadio, obtención de imágenes y tratamiento de los cánceres ginecológicos.**

30 Prioridad: **23.09.1998 US 101522 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

73 Titular/es: **Diadexus, Inc.**  
**343 Oyster Point Boulevard**  
**South San Francisco, California 94080, US**

72 Inventor/es: **Ali, Shujath, M. y**  
**Cafferkey, Robert**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 267 291 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 de diagnóstico, control, determinación del estadio, obtención de imágenes y tratamiento de los cánceres ginecológicos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en parte, a los análisis recién desarrollados para la detección, obtención de imágenes y el tratamiento de cánceres particularmente de cánceres ginecológicos que incluyen el cáncer de ovario, mama, endometrio, útero y el cervicouterino.

10 **Antecedentes de la invención**

15 En las mujeres, los cánceres ginecológicos totalizan más de una cuarta parte de los tumores malignos. Dentro de los cánceres ginecológicos, el más frecuente es el cáncer de mama. Según la Women's Cancer Network, 1 de cada 8 mujeres en los Estados Unidos está en situación de riesgo de desarrollar cáncer de mama y 1 de cada 28 mujeres está en situación de riesgo de morir de cáncer de mama. Aproximadamente el 77% de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama son mayores de 50 años. Sin embargo, el cáncer de mama es la causa principal de muerte entre las edades comprendidas entre 40 y 55 años.

20 El carcinoma de ovario es otro cáncer ginecológico muy frecuente. Aproximadamente una de cada 70 mujeres desarrollará cáncer de ovario durante su vida. Se estima que en 1995 se produjeron 14.500 muertes de cáncer de ovario. Éste causa más muertes que cualquier otro cáncer del sistema genital femenino. El cáncer de ovario con frecuencia no produce síntomas destacables. Algunas posibles señales de advertencia, sin embargo, son un alargamiento del abdomen debido a una acumulación de fluido o molestias digestivas imprecisas (malestar, gases o dilatación) en mujeres mayores de 40 años; raras veces existirán hemorragias vaginales anormales. Son importantes las exploraciones pélvicas periódicas y completas; una prueba de Pap no detecta el cáncer de ovario. Para mujeres mayores de 40 años se recomiendan exploraciones pélvicas anuales.

30 Asimismo en las mujeres es frecuente el cáncer o carcinoma de endometrio del revestimiento interno del útero. Según el Women's Cancer Center el cáncer de endometrio totaliza aproximadamente el 13% de los tumores malignos en las mujeres. Existen aproximadamente 34.000 casos de cáncer de endometrio diagnosticados cada año en los Estados Unidos.

35 El sarcoma de útero es otro tipo de tumor maligno mucho más raro en comparación con otros cánceres ginecológicos. En el sarcoma de útero las células malignas comienzan a desarrollarse en los músculos u otros tejidos conjuntivos del útero. El sarcoma de útero es diferente del cáncer de endometrio, enfermedad en la que las células cancerosas comienzan a desarrollarse en el revestimiento interno del útero. Este cáncer de útero empieza normalmente después de la menopausia. Las mujeres que han recibido terapia con rayos X a alta dosis (terapia de radiación con rayos externos) en su pelvis están en situación de alto riesgo de desarrollar sarcoma de útero. Estos rayos X se administran a veces a las mujeres para interrumpir la hemorragia en el útero.

45 El cáncer de cuello uterino, otro tipo de cáncer frecuente en la mujer, es una enfermedad en la que las células cancerosas (malignas) se encuentran en los tejidos del cuello uterino. El cáncer de cuello uterino se desarrolla normalmente lentamente durante un periodo de tiempo. Antes de que las células cancerosas se encuentren en el cuello uterino, los tejidos del cuello uterino experimentan cambios (conocidos como displasia) en los que comienzan a aparecer células anómalas. Una mancha de Pap identificará normalmente estas células. Después, las células cancerosas comienzan a desarrollarse y propagarse más a fondo en el cuello uterino y a rodear áreas. Dado que normalmente no existen síntomas asociados al cáncer de cuello uterino son críticos los ensayos del cuello uterino. El primero de éstos es una mancha de Pap, que se realiza utilizando una pieza de algodón, un cepillo o una varilla de madera para raspar suavemente la parte externa del cuello uterino a fin de recoger las células. Si se encuentran células anómalas, el doctor extraerá una muestra de tejido (este procedimiento se denomina biopsia) del cuello uterino y examinará al microscopio las células cancerosas. Un paciente puede necesitar ir al hospital si se necesita una muestra mayor en forma de cono (conización). El pronóstico (probabilidades de recuperación) y la selección del tratamiento depende de la selección del estadio (si está nada más que en el cuello uterino o se ha extendido a otros lugares) y de la salud general del paciente.

55 La probabilidad durante la vida de desarrollar cáncer de testículos es del 0,2% para un varón americano blanco. La causa de cáncer de testículos es desconocida, sin embargo, se relaciona tanto con factores congénitos como adquiridos. Desde un punto de vista del tratamiento, el cáncer de testículos se divide en dos categorías principales, no seminoma y seminoma. En el sistema de determinación del estadio utilizado habitualmente para no seminomas, una lesión en el estadio A está confinada en los testículos; en el estadio B existe afectación del ganglio linfático de la zona en el retroperitoneo; y en el estadio C existe metástasis a distancia. Para los seminomas, una lesión en el estadio I está confinada en los testículos; en el estadio II, la lesión se ha extendido a los ganglios linfáticos retroperitoneales; y en el estadio III, la lesión presenta afectación supradiaphragmática ganglionar o visceral.

65 El síntoma más frecuente de cáncer de testículos es la dilatación indolora de los testículos. Se produce dolor testicular agudo resultante de hemorragia intertesticular en el 10% de los casos. Los pacientes con frecuencia son asintomáticos en el momento de la presentación, pero aproximadamente el 10% pueden presentar dolor de espalda, tos

o edema de las extremidades inferiores. Una masa testicular o la dilatación difusa de los testículos puede ser detectada por exploración física en la mayoría de los casos. Se utilizan varios marcadores bioquímicos para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad que incluyen la coriogonadotropina humana (hCG), alfa-fetoproteína y LDH. Sin embargo, inicialmente se hace un diagnóstico incorrecto en hasta el 25% de pacientes con tumores testiculares. Por consiguiente, se necesitan métodos mejorados para el diagnóstico testicular.

Los procedimientos utilizados para detectar, diagnosticar, controlar, determinar el estadio y pronosticar estos cánceres son de importancia crítica para el desenlace del paciente. Los pacientes diagnosticados precozmente presentan generalmente una tasa de supervivencia mucho mayor de cinco años en comparación con la tasa de supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer metastatizado a distancia. Se necesitan evidentemente nuevos métodos de diagnóstico que sean más sensibles y específicos para detectar cánceres precoces.

Los pacientes de cáncer se controlan estrechamente siguiendo la terapia inicial y durante la terapia adyuvante para determinar la respuesta a la terapia y para detectar la enfermedad persistente o periódica o la metástasis. Por lo tanto, existe asimismo una necesidad de marcadores del cáncer que sean más sensibles y específicos para detectar la reincidencia del cáncer.

Otra etapa importante en el tratamiento del cáncer sirve para determinar el estadio de la enfermedad del paciente. La determinación del estadio presenta valor de pronóstico potencial y proporciona criterios para diseñar la terapia óptima. Generalmente, la determinación del estadio patológica del cáncer es preferible sobre la determinación del estadio clínica porque la anterior proporciona un pronóstico más preciso. Sin embargo, se preferiría la determinación del estadio clínica cuando ésta sea por lo menos tan precisa como la determinación del estadio patológica porque no depende de un procedimiento invasor para obtener el tejido destinado a la evaluación patológica. La determinación del estadio del cáncer mejoraría detectando nuevos marcadores en las células, tejidos o fluidos corporales que podrían diferenciar diferentes estadios de invasión.

En la presente invención se proporcionan métodos para la detección, obtención de imágenes y tratamiento de cánceres ginecológicos mediante un Gen Específico del Cáncer con la SEC. ID. n°: 1 o una proteína codificada por éste (CSG). El CSG se refiere, entre otras cosas, a la proteína natural expresada por el gen que comprende la secuencia polinucleotídica de SEC. ID. n°: 1. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por la SEC. ID. n°: 1 se representa en la presente memoria como SEC. ID. n°: 2. En la alternativa, CSG tal como se utiliza en la presente memoria, significa el ARNm natural codificado por el gen que comprende la secuencia polinucleotídica de SEC. ID. n°: 1 o las concentraciones del gen que comprende la secuencia polinucleotídica de SEC. ID. n°: 1.

Otros objetivos, propiedades, ventajas y aspectos resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción siguiente. Debe apreciarse, sin embargo, que la descripción siguiente y los ejemplos específicos, a la vez que indican las formas de realización específicas de la invención se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

#### Sumario de la invención

Respecto a estos y otros propósitos, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método para detectar la presencia de cánceres ginecológicos analizando los cambios en las concentraciones de CSG en las células, tejidos o fluidos corporales en comparación con las concentraciones de CSG preferentemente en las mismas células, tejidos o tipo de fluido corporal de un control humano normal, en el que un aumento al doble de las concentraciones de CSG en el paciente frente al control humano normal se asocia a un cáncer ginecológico.

Además se proporcionan anticuerpos contra CSG o fragmentos de dichos anticuerpos que pueden utilizarse para identificar o localizar por imagen el CSG en un paciente con el fin de detectar o diagnosticar una enfermedad o afección. Dichos anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales u omniconales o prepararse por técnicas de biología molecular. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria y la descripción siguiente significa además que incluye aptámeros y oligonucleótidos de una sola cadena tales como los derivados de un protocolo de evolución *in vitro* denominado SELEX y bien conocidos por el experto en la materia. Los anticuerpos pueden estar marcados con una variedad de marcadores detectables que incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos y metales paramagnéticos. Estos anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden utilizarse también como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la expresión de un CSG. En las aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo puede utilizarse sin o con modificación a un agente citotóxico, tal como radioisótopo, enzima, toxina, fármaco o profármaco.

Otros objetivos, propiedades, ventajas y aspectos resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción siguiente. Debe apreciarse, sin embargo, que la descripción siguiente y los ejemplos específicos, a la vez que indican las formas de realización específicas de la invención se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

#### Descripción detallada de la invención

Según la presente invención se proporciona un método para detectar la presencia de un cáncer ginecológico en un individuo, comprendiendo el método:

## ES 2 267 291 T3

(a) medir las concentraciones de (i) una secuencia polinucleotídica que comprende la SEC. ID n°: 1, (ii) un ARNm nativo codificado por la secuencia polinucleotídica de la SEC. ID n°: 1, o (iii) una proteína natural codificada por la secuencia polinucleotídica de (i) o (ii), en una muestra de células, tejidos o fluidos corporales extraídos del individuo; y

(b) comparar las concentraciones medidas de (i), (ii) o (iii) con las concentraciones de (i), (ii) o (iii) en una muestra en células, tejidos o fluidos corporales extraídos de un control humano normal, en el que por lo menos un aumento al doble en las concentraciones medidas de (i), (ii) o (iii) en el individuo frente a las concentraciones de (i), (ii) o (iii) en el control humano normal está asociado a la presencia de un cáncer ginecológico.

Según la presente invención se proporciona la utilización de un anticuerpo contra una proteína natural codificada por (i) la secuencia polinucleotídica de una secuencia polinucleotídica que comprende la SEC. ID n°: 1 o (ii) un ARNm codificado por la secuencia polinucleotídica de la SEC. ID. n°: 1 para la preparación de una composición destinada a la obtención de imágenes del cáncer cervicouterino, de endometrio, uterino o de mama.

Preferentemente, el anticuerpo está marcado con iones paramagnéticos o un radioisótopo.

Según la presente invención se proporciona la utilización de un anticuerpo contra una proteína natural codificada por (i) la secuencia polinucleotídica de una secuencia polinucleotídica que comprende la SEC. ID n°: 1 o (ii) un ARNm codificado por la secuencia polinucleotídica de la SEC. ID. n°: 1 para la preparación de una composición destinada al tratamiento del cáncer cervicouterino, de endometrio, uterino o de mama.

Preferentemente, el anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico.

Preferentemente, el cáncer es cáncer de mama.

La presente invención se refiere a análisis y métodos de diagnóstico, tanto cuantitativos como cualitativos para la detección, diagnóstico, controlar, determinación del estadio y pronóstico de cánceres comparando las concentraciones de CSG con las de CSG en un control humano normal.

Concentraciones de CSG tal como se utiliza en la presente memoria significa las concentraciones de la proteína natural expresadas por el gen que comprende la secuencia polinucleotídica de SEC. ID. n°: 1. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por la SEC. ID. n°: 1 se representa en la presente memoria como SEC. ID. n°: 2. Alternativamente, CSG tal como se utiliza en la presente memoria, significa las concentraciones del ARNm natural codificado por el gen que comprende la secuencia polinucleotídica de SEC. ID. n°: 1 o las concentraciones del gen que comprende la secuencia polinucleotídica de SEC. ID. n°: 1. Dichas concentraciones se miden preferentemente en, por lo menos, una de las células, tejidos y/o fluidos corporales, incluyendo la determinación de concentraciones normales y anormales. De este modo, por ejemplo, un análisis de diagnóstico según la invención para diagnosticar la sobreexpresión de la proteína CSG en comparación con fluidos corporales, células o muestras de tejido de referencia normales pueden utilizarse para diagnosticar la presencia de cánceres, incluyendo los cánceres ginecológicos tales como el de mama, ovario, uterino, de endometrio y el cáncer cervicouterino.

Todos los métodos de la presente invención pueden incluir opcionalmente la medición de las concentraciones de otros marcadores de cáncer así como CSG. Otros marcadores de cáncer, además de CSG, útiles en la presente invención dependerán del cáncer que se esté analizando y son conocidos por el experto en la materia.

### *Análisis de diagnóstico*

La presente invención proporciona métodos para diagnosticar la presencia de cánceres ginecológicos analizando por cambios en las concentraciones de CSG en las células, tejidos o fluidos corporales en comparación con las concentraciones de CSG en las células, tejidos o fluidos corporales preferentemente del mismo tipo procedente de un control humano normal, en el que un aumento en las concentraciones de CSG en el paciente frente al control humano normal se asocia a la presencia de un cáncer ginecológico tal como de ovario, mama, uterino, de endometrio o cáncer cervicouterino, o cáncer testicular.

Típicamente, para un análisis de diagnóstico cuantitativo un resultado positivo que indica que el paciente que está siendo analizado presenta cáncer es que las concentraciones en las células, tejidos o fluido corporal del marcador del cáncer, tal como CSG, son por lo menos dos veces mayores, y más preferentemente son por lo menos cinco veces mayores, que preferentemente en las mismas células, tejidos o fluido corporal de un control humano normal.

En la presente invención, las concentraciones de marcador de cáncer medidas en dichas células, tejidos o fluido corporal son de CSG, y se comparan con las concentraciones de CSG preferentemente en las mismas células, tejido o tipo de fluido corporal de un control humano normal. Esto es, si el marcador de cáncer que se está observando es CSG en suero, esta concentración se compara preferentemente con la concentración de CSG en el suero de un paciente humano normal.

Tal como se utiliza en la presente memoria, control humano normal incluye un paciente humano sin cáncer y/o las muestras no cancerosas del paciente; en los métodos para diagnosticar o controlar la metástasis, el control humano normal puede incluir también muestras de un paciente humano en las que se determina por métodos fiables que presenta un cáncer ginecológico o un cáncer testicular no metastatizado tal como las muestras procedentes del mismo paciente antes de la metástasis.

#### *Técnicas de análisis*

Las técnicas de análisis que pueden utilizarse para determinar las concentraciones de la expresión génica (incluyendo las concentraciones de proteínas) tales como el CSG de la presente invención, en una muestra procedente de un paciente son bien conocidas por el experto en la materia. Dichos métodos de análisis incluyen, sin limitarse a, radioinmunoanálisis, análisis de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), análisis por inmunohistoquímica, análisis de hibridación *in situ*, análisis de unión competitiva, análisis por transferencia Western, análisis ELISA y métodos proteómicos: electroforesis en gel en dos dimensiones (electroforesis 2D) y métodos sin gel tales como la espectrometría de masas o la caracterización por interacción proteica. Entre éstas, se prefieren frecuentemente los ELISA para diagnosticar una proteína expresada del gen en los fluidos biológicos.

Un análisis ELISA comprende inicialmente la preparación de un anticuerpo, si no se encuentra fácilmente en un proveedor comercial, específico para CSG, preferentemente un anticuerpo monoclonal. Además, se prepara generalmente un anticuerpo indicador que se fija específicamente a CSG. El anticuerpo indicador se acopla a un reactivo detectable tal como un reactivo radioactivo, fluorescente o enzimático, por ejemplo la enzima peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina.

Para realizar el ELISA, se incuba el anticuerpo específico para CSG sobre un soporte sólido, p. ej. una placa de poliestireno, que se fija al anticuerpo. Se cubren a continuación alguno de los puntos libres de fijación a la proteína en la placa incubando con una proteína no específica tal como albúmina de suero bovino. A continuación, la muestra que debe analizarse se incuba en la placa, durante cuyo periodo el CSG se fija al anticuerpo específico acoplado a la placa de poliestireno. La muestra no unida se lava con tampón. Un anticuerpo indicador especialmente dirigido contra CSG y unido a la peroxidasa de rábano picante se coloca en la placa produciendo la fijación del anticuerpo indicador a cualquier anticuerpo monoclonal unido a CSG. El anticuerpo indicador no acoplado se lava a continuación. Se añaden a continuación reactivos a la placa para la actividad de peroxidasa, incluyendo un sustrato colorimétrico. La peroxidasa inmovilizada, ligada a anticuerpos con CSG, produce un producto de reacción coloreado. La cantidad de color desarrollado en un periodo de tiempo dado es proporcional a la cantidad de proteína con CSG presente en la muestra. Se obtienen resultados cuantitativos típicamente con relación a una curva patrón.

Puede emplearse un análisis competitivo en el que los anticuerpos específicos para CSG acoplados a un soporte sólido y a CSG marcado y una muestra procedente del huésped se pasan sobre el soporte sólido y la cantidad de marcador detectado unido al soporte sólido puede correlacionarse con una cantidad de CSG en la muestra.

Pueden utilizarse métodos de ácido nucleico para detectar ARNm con CSG como marcador para el cáncer de ovario y de testículos. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) y otros métodos con ácido nucleico, tales como la reacción en cadena de ligasa (LCR) y la ampliación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASABA) pueden utilizarse para detectar las células cancerosas para el diagnóstico y el control de varios tumores malignos. Por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una técnica potente que puede utilizarse para detectar la presencia de una población de ARNm específica en una mezcla compleja de miles de otras especies de ARNm. En RT-PCR, una especie de ARNm se transcribe a la inversa en primer lugar en ADN complementario (ADNc) con la utilización de la enzima transcriptasa inversa; el ADNc se amplía a continuación como en una reacción PCR normal. RT-PCR puede poner de manifiesto de este modo por ampliación la presencia de una especie única de ARNm. Por consiguiente, si el ARNm es muy específico para la célula que lo produce, RT-PCR puede utilizarse para identificar la presencia de un tipo específico de célula.

La hibridación a clones u oligonucleótidos ordenados sobre un soporte sólido (es decir cuadrícula) puede utilizarse para detectar tanto la expresión del gen como para cuantificar el nivel de expresión de este gen. En este método, un ADNc que codifica el gen CSG se fija a un sustrato. El sustrato puede ser de cualquier tipo adecuado incluyendo pero sin limitarse a vidrio, nitrocelulosa, nilón o plástico. Por lo menos una parte del ADN que codifica el gen con CSG está unida al sustrato y a continuación se incuba con el analito, que puede ser ARN o una copia del ADN complementario (ADNc) del ARN, aislado del tejido de interés. La hibridación entre el ADN unido al sustrato y el analito puede detectarse y caracterizarse por varios métodos incluyendo pero sin limitarse al marcaje radioactivo o al marcaje por fluorescencia del analito o de una molécula secundaria diseñada para detectar al híbrido. La cuantificación del nivel de expresión génica puede realizarse por comparación de la intensidad de la señal procedente del analito en comparación con la determinada a partir de patrones conocidos. Pueden obtenerse patrones por transcripción *in vitro* del gen diana, cuantificando el campo y a continuación utilizando este material para generar una curva patrón.

De los métodos proteómicos, la electroforesis 2D es una técnica bien conocida por el experto en la materia. El aislamiento de proteínas individuales de una muestra tal como suero se realiza utilizando la separación sucesiva de proteínas por las características diferentes normalmente en geles de poliacrilamida. En primer lugar, se separan las proteínas por tamaños utilizando una corriente eléctrica. La corriente actúa uniformemente sobre todas las proteínas, de manera que las proteínas más pequeñas se mueven más rápidamente en el gel que las proteínas mayores. La segunda

dimensión se aplica a una corriente perpendicular a la primera y separa las proteínas no basándose en el tamaño sino en la carga eléctrica específica transportada por cada proteína. Dado que nunca dos proteínas con diferentes secuencias son idénticas sobre la base tanto a las dimensiones como a la carga, el resultado de una separación 2D es un gel cuadrado en el que cada proteína ocupa un único punto. El análisis de los puntos con sondas químicas o de anticuerpo, o el microsecuenciado de proteínas posterior puede poner de manifiesto la abundancia relativa de una proteína dada y la identidad de las proteínas en la muestra.

Los análisis anteriores pueden realizarse en muestras procedentes de una variedad de células, fluidos corporales y/o extractos tisulares de pacientes (homogeneizados o tejido solubilizado) tal como las procedentes de biopsia de tejido y de material de autopsia. Los fluidos corporales útiles en la presente invención comprenden sangre, orina, saliva o cualquier otra secreción corporal o derivados de los mismos. La sangre puede comprender sangre completa, plasma, suero o cualquier derivado de la sangre.

#### *Utilización de anticuerpos in vivo*

Pueden utilizarse también *in vivo* anticuerpos contra CSG en los pacientes que se sospecha que padecen cánceres ginecológicos tales como cáncer de ovario, mama, endometrio, de útero o cervicouterino. Específicamente, los anticuerpos contra un CSG pueden inyectarse a un paciente que se sospecha que presenta un cáncer ginecológico con fines de diagnóstico y/o terapéuticos. La utilización de anticuerpos para el diagnóstico *in vivo* es bien conocida en la materia. Por ejemplo, se han descrito los anticuerpo-quelantes marcados con indio-111 para su utilización en la obtención de imágenes radioinmunocelestográficas de los tumores que expresan antígeno carcinoembrionario (Summerdon *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* 1990 17:247-254). En particular, estos anticuerpo-quelantes se han utilizado en la detección de tumores en pacientes que se sospecha que presentan cáncer colorrectal recidivo (Griffin *et al.*, *J. Clin. Onc.* 1991 9:631-640). También han sido descritos (Laufer, R. B. *Magnetic Resonance in Medicine* 1991 22:339-342) los anticuerpos con iones paramagnéticos como marcadores para su utilización en el diagnóstico por resonancia magnética. Los anticuerpos dirigidos contra las CSG pueden utilizarse de manera similar. Los anticuerpos marcados contra una CSG pueden inyectarse en pacientes que se sospecha que presentan un cáncer ginecológico o un cáncer de testículos con el fin de diagnosticar o determinar el estadio el estado de la enfermedad del paciente. El marcador utilizado se seleccionará de acuerdo con la modalidad de obtención de imágenes que se utilice. Por ejemplo, los marcadores radioactivos tales como indio-111, tecnecio-99m o yodo-131 pueden utilizarse para exploraciones en el plano o tomografía computerizada por emisión de fotones individuales (SPECT). Los marcadores emisores de positrones tales como flúor-19 pueden utilizarse en la tomografía de emisión de positrones. Los iones paramagnéticos tales como gadolinio (III) o manganeso (II) pueden utilizarse en diagnóstico por resonancia magnética (MRI). La localización del marcador permite la determinación de la propagación del cáncer. La cantidad de marcador en un órgano o tejido también permite la determinación de la presencia o ausencia de cáncer en este órgano o tejido.

Para los pacientes diagnosticados de cáncer ginecológico o testicular, la inyección de un anticuerpo contra una CSG puede presentar también una utilidad terapéutica. El anticuerpo puede ejercer su efecto terapéutico solo. Alternativamente, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico tal como un fármaco, toxina o radionucleido para potenciar su efecto terapéutico. Los anticuerpos monoclonales farmacéuticos han sido descritos en la materia por ejemplo por Garnett y Baldwin, *Cancer Research* 1986 46:2407-2412. La utilización de toxinas conjugadas con anticuerpos monoclonales para la terapia de varios cánceres ha sido descrita también por Pastan *et al.*, *Cell* 1986 47:641-648. Anticuerpos monoclonales marcados con Itrio-90 han sido descritos para la maximización de la dosis administrada al tumor aunque limitando la toxicidad a los tejidos normales (Goodwin y Meares *Cancer Supplement* 1997 80:2675-2680). Otros radionucleidos citotóxicos que incluyen, pero no se limitan a cobre-67, yodo-131 y renio-186, pueden utilizarse asimismo para el marcado de anticuerpos contra los CSG.

Los anticuerpos que pueden utilizarse en estos métodos *in vivo* incluyen tanto anticuerpos policlonales, monoclonales u omniconales como anticuerpos preparados por técnicas de biología molecular. Pueden asimismo utilizarse los fragmentos de anticuerpo y aptámeros y oligonucleótidos de una sola cadena tales como los procedentes de un protocolo de evolución *in vitro* denominados SELEX y bien conocidos por el experto en la materia.

#### **Ejemplos**

La presente invención se describe con mayor detalle a partir de los ejemplos siguientes. Estos ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención haciendo referencia a las formas de realización específicas. Esta ejemplificación, aunque ilustra determinados aspectos de la invención, no limita el alcance de la invención expuesta.

#### 60 Ejemplo 1

La identificación de la CSG de la SEC. ID n°: 1 se realizó mediante un análisis generalizado de los datos en la base de datos LIFESEQ disponible en Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, utilizando la herramienta de búsqueda del subajuste de la base de datos LIFESEQ disponible en Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA. Las herramientas de búsqueda incluyen: Comparación de bancos que compara un banco con otro banco y permite la identificación de clones expresados en el tumor y ausentes o expresados a un nivel inferior en tejido normal; subajuste que es similar a la comparación de bancos pero permite la identificación de clones expresados en un grupo de bancos y ausente o expresada a un nivel inferior en un segundo grupo de bancos; y la obtención de imágenes del transcrito que da

## ES 2 267 291 T3

una lista de todos los clones en un banco individual o un grupo de bancos basados en la abundancia. Los clones individuales se examinan utilizando transferencias Northern electrónicas para determinar las procedencias del tejido de sus componentes EST.

5 Los ejemplos siguientes fueron realizados utilizando técnicas normalizadas y de rutina, que son bien conocidas por el experto en la materia, excepto donde se describen de otra manera en detalle. Las técnicas de biología molecular de rutina del ejemplo siguiente pueden realizarse como se describe en los manuales de laboratorio habituales, tales como Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

10

Ejemplo

### *Cuantificación relativa de la expresión génica*

15 La PCR cuantitativa en tiempo real con sondas Taqman fluorescentes es un sistema de detección cuantitativa que utiliza la actividad de 5'-3' nucleasa de la Taq ADN polimerasa. El método utiliza una sonda de oligonucleótidos fluorescente interna (Taqman) marcada con un colorante indicador en 5' y un colorante extintor en 3'. Durante la PCR, la actividad de la nucleasa 5'-3' de la Taq ADN polimerasa libera el indicador, cuya fluorescencia puede detectarse a continuación mediante el detector láser del sistema de detección de secuencias modelo 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

20 Se utilizó la ampliación de una referencia endógena para normalizar la cantidad de ARN de la muestra añadido a la reacción y normalizar la eficacia de la transcriptasa inversa (RT). Se utilizó ciclofilina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o ADN ribosómico (ARNr) 18S como esta referencia endógena. Para calcular la cuantificación relativa entre todas las muestras estudiadas, se utilizaron las concentraciones de ARN diana para una muestra como base para los resultados comparativos (calibrador). La cuantificación relativa al "calibrador" se obtiene utilizando el método de la curva patrón o el método comparativo (User Bulletin nº 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System).

30 Se evaluaron la distribución del tejido y la concentración del gen diana en tejido normal y canceroso. Se extrajo ARN completo de tejidos normales, de tejidos cancerosos y de cánceres y los tejidos adyacentes compatibles correspondientes. A continuación, se preparó la primera cadena de ADNc con transcriptasa inversa y se realizó la reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores y la sonda específica Taqman para cada gen diana. Los resultados se analizan utilizando el detector de secuencias ABI PRISM 7700. Las cifras absolutas y los niveles relativos de expresión del gen diana en un tejido específico se comparan con los del tejido calibrador.

35 *Medición de la SEC. ID nº: 1; clon ID 1450626; gen ID 236019 ("Pro104")*

40 Las cifras absolutas representadas en la Tabla 1 son los niveles relativos de expresión de Pro104 en 12 tejidos diferentes normales. Todos los valores se comparan con las del colon normal (calibrador). Estas muestras de ARN son grupos disponibles en el mercado, originados por agrupamiento de muestras de un tejido específico procedentes de individuos diferentes.

45

TABLA 1

### *Niveles relativos de la expresión de Pro104 en muestras agrupadas*

50

Tejido	Normal
Colon ascendente	1,0
Endometrio	0
Riñón	0
Hígado	0
Ovario	0
Páncreas	0
Próstata	1,0
Intestino delgado	0

65

## ES 2 267 291 T3

TABLA 1 (continuación)

	Normal
Tejido	
Bazo	0
Estómago	0
Testículos	100
Útero	0

Los niveles relativos de expresión en la Tabla 1 demuestran que el ARNm Pro104 no se expresa en el ovario normal. Su expresión es, sin embargo, mayor (100) en los testículos en comparación con los demás tejidos normales analizados. Los testículos, con un nivel de expresión relativo de 100, próstata (1,0) y colon (1,0) son los únicos tejidos que expresan ARNm para Pro104.

Las cifras absolutas en la Tabla 1 se obtuvieron analizando grupos de muestras de un tejido específico de diferentes individuos. No pueden compararse con las cifras absolutas originadas en el ARN extraído de muestras de tejido de un solo individuo en la Tabla 2.

Las cifras absolutas reseñadas en la Tabla 2 son niveles de expresión relativos de Pro104 en 70 pares compatibles de muestras de tejido y 30 pares incompatibles. Todos los valores se comparan con el colon normal (calibrador). Un par compatible está formado por ARNm procedente de la muestra de cáncer para un tejido específico y ARNm procedente de la muestra adyacente normal para este mismo tejido (NAT) del mismo individuo. En los cánceres (por ejemplo, de ovario) donde no fue posible extraer muestras adyacentes normales del mismo individuo, se analizaron las muestras de un individuo normal diferente.

TABLA 2

*Niveles relativos de expresión de Pro104 en muestras individuales*

ID de la muestra	Tipo de cáncer	Tejido	Cáncer	Emparejamiento o NAT
OVR10370/ 1038	Adenocarcinoma papilar seroso	Ovario 1	187,3	0,6
OVR1305/ 13060	Adenocarcinoma papilar seroso	Ovario 2	56,3	0
OVR9410C360	Adenocarcinoma de endometrio	Ovario 3	0,9	
OVR14604AA1C	Cáncer	Ovario 4	9,1	
OVR11570	Adenocarcinoma papilar seroso	Ovario 5	10,26	
OVR10400	Adenocarcinoma papilar seroso	Ovario 6	169,3	
OVR14471A1B	Adenocarcinoma	Ovario 7	0,3	
OVR10280	Carcinoma de ovario	Ovario 8	3,2	
OVR11180	Carcinoma de microcitos	Ovario 9	0,05	
OVR7730	Adenocarcinoma papilar seroso metastásico	Ovario 10	1,3	
OVR14603A1D	Adenocarcinoma	Ovario 11	3,5	
OVR10050	Papilar seroso y de endometrio	Ovario 12	15	
OVR9702C018 G	Quiste normal	Ovario 13		1,2
OVR206I	Quiste pequeño atrófico normal izquierdo	Ovario 14		0,2

## ES 2 267 291 T3

TABLA 2 (continuación)

5	ID de la muestra	Tipo de cáncer	Tejido	Cáncer	Emparejamiento o NAT
	OVR9702C020 G	Quistes de ovario múltiples, normales	Ovario 15		0,1
	OVR9702C025 G	Quiste CL con hemorragia, normal	Ovario 16		0,4
10	OVR9701C035 G	Normal	Ovario 17		0
	OVR9701C040 G	Quistes benignos foliculares, normales	Ovario 18		0
15	OVR9701C050 G	Quistes de ovario múltiples, normales	Ovario 19		0
	OVR9701C109 R	Normal	Ovario 20		0
	OVR9702C004 G	Normal	Ovario 21		0
20	OVR9702C007	Normal	Ovario 22		0
	OVR9701C087 R	Quistes foliculares pequeños, normales	Ovario 23		0
25	OVR9411C109	Normal	Ovario 24		0
	OVR9701C177 a	Quístico, normal	Ovario 25		0
	OVR9701c179 A	Normal	Ovario 26		0,05
30	OVR1461O	Quistadenofibroma seroso	Ovario 27		0
	OVR14638A1C	Quiste folicular derecho	Ovario 28		0
35	OVR9411C057 R	Quiste endométrico grande benigno	Ovario 29		0
	UTR1358O/ 13590	Tumor/NAT	Útero 1	0	0
40	UTR1417O/ 14180	Tumor maligno/NAT	Útero 2	4,51	0,5
	UTR233U96/ 234U96	Adenocarcinoma/NAT	Útero 3	4,24	1,67
	UTR850U/ 851U	Cáncer de endometrio en estadio 1/NAT	Útero 4	2,4	0
45	END10479B/ 10479D	Enfermedad/NAT	Endometrio 1	15,2	0
	END9705A125 A/126	Carcinoma de endometrio/NAT	Endometrio 2	4,67	0,53
50	END9704C281 A/282	Adenocarcinoma de endometrio/NAT	Endometrio 3	2,54	0,36
	END14863A1A/A2A	Carcin. de endometrio moderadamente difer./NAT	Endometrio 4	0,32	0,31
55	END9709C056 A/C055a	Adenocarcinoma de endometrio/NAT	Endometrio 5	0,41	0,29
	END	de endometrio invasivo	Endometrio 6	0,09	1,36
60	END8911A/ 8911D	Enfermedad/NAT	Endometrio 7	0	0,7
	END8963A/ 8963B	Enfermedad/NAT	Endometrio 8	0	0
	END9807A080 A/081	Carcinoma de endometrio/NAT	Endometrio 9	0,15	0,09
65	END9705A0/ 9705A0		Endometrio 10	0	0

## ES 2 267 291 T3

TABLA 2 (continuación)

5	ID de la muestra	Tipo de cáncer	Tejido	Cáncer	Emparejamiento o NAT
	CVXVNM00/ VNM00		Cuello uterino 1	0,1	0
	CVXVNM00/ VNM00		Cuello uterino 2	0,4	0
10	CVXIND000/ IND000		Cuello uterino 3	47,3	12,4
	CVXIND000/ IND000		Cuello uterino 4	0,5	0,3
15	MAMM826I/ 828I	Adenocarcinoma canalicular infiltrante/NAT	De mama 1	0,1	0
	MAMM473P/ 475P	Enfermedad/NAT	De mama 2	0	0
20	MAMM9706A06 6G/67	Enfermedad/NAT	De mama 3	0,08	0,17
	MAMM9703B01 1d/b	Adenocarcinoma canalicular infiltrante/NAT	De mama 4	1,76	0,26
25	MAMM0008603 M	Cáncer de mama canalicular infiltrante	De mama 5	0	
	MAMM9703A00 4B	Normal	De mama 6		0
30	STM4004864/ 4864		Estómago 1	0,43	0,47
	STM4004509/ 4509		Estómago 2	0,7	51,94
	STM4004154/4154		Estómago 3	0,21	0,11
35	STM4004317/4317		Estómago 4	0	0,12
	CLN4004535A 2/B2	Adenocarcinoma de colon ascendente, estadio D	Colon 1	0	0
40	CLN	De recto, estadio A	Colon 2	0	0
	CLN	Rectosigmoideo, estadio A	Colon 3	0	0
45	CLN9612B006/ B005	Adenocarcinoma de ciego, colon ascendente	Colon 4	0	0
	CLN703C091R/ 92RB	Rectosigmoideo, estadio T1	Colon 5	0	0
50	LNG476Q/477 Q	Carcinoma del pulmón derecho	Pulmón 1	0	0
	LNG605L/606 L	Carcinoma del pulmón derecho	Pulmón 2	0	0
55	LNG750C/751 C	Sarcoma osteógeno metastásico	Pulmón 3	0	0
	PANC714L/715L	Adenoma vellosa	Páncreas 1	0	0
	PANC824P/ 825P	Adenoma quístico	Páncreas 2	0	0
60	PANC1034a/10343b		Páncreas 3	0,52	1,15
	PANC776P/ 777P		Páncreas 4	0,11	0,08
65	PANC9210/ 9220		Páncreas 5	109,81	0
	LIV150A/ 151A	Carcinoma hepatocelular	Hígado 1	0	0

## ES 2 267 291 T3

TABLA 2 (continuación)

5	ID de la muestra	Tipo de cáncer	Tejido	Cáncer	Emparejamiento o NAT
	LIV942A/ 943A	Hepatoblastoma	Hígado 2	0	0
	LIV12742B/ 12742C		Hígado 3	0,06	0
10	BLD327K/328 K	Carcinoma papilar de monocitos/NAT	Vejiga 1	0	0
	BLD467K/468 K	Carcinoma urotelial en alto grado de peso consistente	Vejiga 2	0	0
15	BLD1496K/ 1497K		Vejiga 3	0,6	0,2
	BLD172K/ 1722K		Vejiga 4	0	0
20	KID1064D/ 1065D	Tumor/NAT	Riñón 1	0	0
	KID1079D/ 1080D	Tumor/NAT	Riñón 2	0,3	0,4
	KID1097D/ 1098D	Tumor/NAT	Riñón 3	0,0	0
25	KID1263D/ 1264D	Tumor/NAT	Riñón 4	0	0
	KID512D/ 513D	Carcinoma de hepatocitos palpable	Riñón 5	0,1	0,13
30	KID689D/690 D	Carcinoma de riñón	Riñón 6	1,82	0
	KID988D/989 D	Carcinoma de hepatocitos	Riñón 7	1,7	0,2
35	KID1024D/ 1025D		Riñón 8	0	0
	KID1183D/ 1184D		Riñón 9	0,7	0,1
	KID1229D/ 1230D		Riñón 10	0	9,2
40	PRO1291B/ 1292B	Adenocarcinoma/NAT	Próstata 1	11,9	0,2
	PRO209B/ 210B	Adenocarcinoma de próstata/NAT	Próstata 2	0	0
45	PRO1222B/ 1223B	Adenocarcinoma/NAT	Próstata 3	19,9	3,2
	PRO1293B/ 1294B	Adenocarcinoma/NAT	Próstata 4	0,7	4,4
	PRO650B/651B	Adenocarcinoma/NAT	Próstata 5	1,34	0,15
50	PRO694B/695 B		Próstata 6	0	0
	PRO780B/781 B	Adenocarcinoma/NAT	Próstata 7	0,2	0,8
55	PRO845B/846 B	Adenocarcinoma/NAT	Próstata 8	0,2	0
	PRO902B/903 B		Próstata 9	0	0
	PRO916B/917 B	Tumor/NATURAL	Próstata 10	0	0
60	PRO1012B/ 1013B		Próstata 11	3,27	2,74
	PRO139B/140 B		Próstata 12	0,19	0,01
65	TST239X/240 X	Tumor/NAT	Testículos 1	1,66	8,19
0= Negativo					

## ES 2 267 291 T3

En el análisis de todas las muestras, existieron niveles mayores de expresión en el tumor de ovario (mediana 6,3), lo que demuestra un alto grado de especificidad para el cáncer de ovario. La expresión de Pro104 se encontró también en otros cánceres de los tejidos genitales femeninos incluyendo el cuello uterino, endometrio, útero y mamas. El nivel de la mediana en estos tejidos fue 3,2. De todas las muestras (aparte de los tejidos genitales femeninos) analizadas, solamente una muestra (la muestra de cáncer Páncreas 5 con 109,81) presentaba una expresión comparable a la expresión del ARNm en el cáncer de ovario. La mediana para la expresión de Pro104 para los demás tejidos cancerosos fue cero.

Se comparó también el nivel de expresión de ARNm en las muestras de cáncer y en el tejido adyacente normal isógeno del mismo individuo o en el tejido adyacente normal de un individuo diferente. Esta comparación proporciona una indicación de especificidad para el estadio de cáncer (p. ej., niveles mayores de la expresión del ARNm en la muestra de cáncer comparados con el adyacente normal). La Tabla 2 presenta una producción de la expresión de Pro104 en 2 tejidos de cáncer de ovario en comparación con su adyacente normal respectivo (muestras de ovario n° 1, 2) y, la producción de Pro104 en 10 tejidos de cáncer incompatibles (muestras de ovario n° 3 a 12) en comparación con 17 tejidos adyacentes normales (muestras de ovario n° 13 a 29). Hubo producción de expresión de Pro104 en el tejido canceroso para el 100% de las muestras de ovario analizadas (un total de 2 compatibles y 10 incompatibles). Sin embargo, el 71% de las muestras de tejido adyacente normal fueron negativas, y el 29% (5 de 17) presentaban un nivel bajo de la expresión de Pro104 de 0,051, 2 unidades normalizadas.

En total, la ausencia de expresión en el 71% de los tejidos adyacentes normales (con expresión insignificante en el 29% restante de adyacentes normales), más el nivel mayor de expresión de ARNm en el 100% de las muestras de tumor de ovario analizadas es indicativo de que Pro104 es un marcador de diagnóstico para el cáncer de ovario. La expresión de este marcador en los cánceres de cuello uterino, endometrio, útero y de mama, es indicativo de que P104 es también un marcador de diagnóstico en otros cánceres ginecológicos.

Basándose en la composición de aminoácidos representada en la SEC. ID n°: 2, Pro104 es una serina proteasa que comparte el 37% de homología con la hepsina humana en cuanto a nucleótidos, y el 31% de homología en cuanto a aminoácidos. Cuando se compara con otras varias serina proteasas tales como calicreína-1, calicreína-2, antígeno específico de la próstata, prostasina, proteasa M y hepsina, Pro104 comparte todos los motivos de aminoácidos conservados que son característicos de las demás serina proteasas. Por ejemplo, Pro104 contiene una secuencia RIVGG (SEC. ID n°: 3) muy conservada. La escisión entre arginina (R) e isoleucina (I) produce la activación de las proteasas que contienen el motivo (Kurachi *et al.* *Hepsin. Methods in Enzymology*, vol. 244, págs. 100-114 (1994)). El dominio de proteasa activo de Pro104 por lo tanto consta de 273 aminoácidos. Pro104 contiene también los restos conservados de histidina, ácido aspártico y serina que forman una triada catalítica para la función enzimática.

REIVINDICACIONES

5 1. Método para detectar la presencia de un cáncer ginecológico en un individuo, comprendiendo el método las etapas siguientes:

10 (a) medir las concentraciones de (i) una secuencia polinucleotídica que comprende la SEC. ID n°: 1, (ii) un ARNm natural codificado por la secuencia polinucleotídica de la SEC. ID n°: 1, o (iii) una proteína natural codificada por la secuencia polinucleotídica de (i) o (ii), en una muestra de células, tejidos o fluidos corporales extraídos del individuo; y

15 (b) comparar las concentraciones medidas de (i), (ii) o (iii) con las concentraciones de (i), (ii) o (iii) en una muestra de células, tejidos o fluidos corporales extraídos de un control humano normal, en el que por lo menos un aumento al doble en las concentraciones medidas de (i), (ii) o (iii) en el individuo frente a las concentraciones de (i), (ii) o (iii) en el control humano normal está asociado a la presencia de un cáncer ginecológico.

20 2. Utilización de un anticuerpo contra una proteína natural codificada por (i) la secuencia polinucleotídica de una secuencia polinucleotídica que comprende la SEC. ID n°: 1 o (ii) un ARNm codificado por la secuencia polinucleotídica de la SEC. ID. n°: 1 para la preparación de una composición destinada a la obtención de imágenes del cáncer cervicouterino, de endometrio, uterino o de mama.

25 3. Utilización según la reivindicación 2, en la que el anticuerpo está marcado con iones paramagnéticos o un radioisótopo.

30 4. Utilización de un anticuerpo contra una proteína natural codificada por (i) la secuencia polinucleotídica de una secuencia polinucleotídica que comprende la SEC. ID n°: 1 o (ii) un ARNm nativo codificado por la secuencia polinucleotídica de la SEC. ID. n°: 1 para la preparación de una composición destinada al tratamiento del cáncer cervicouterino, de endometrio, uterino o de mama.

35 5. Utilización según la reivindicación 4, en la que dicho anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico.

40 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que el cáncer es el cáncer de mama.

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 267 291 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Shujath, Ali M.  
Cafferkey, Robert  
5 DIADEXUS LLC

<120> Método de diagnóstico, control, determinación del estadio, obtención de imágenes y tratamiento de cánceres  
ginecológicos y de cáncer testicular  
10

<130> DEX-0044

<140>

15 <141>

<150> 60/101,522  
<151> 23.09.1998

20 <160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

25 <210> 1  
<211> 1081  
<212> ADN  
30 <213> *Homo sapiens*

```
35      aggaggcaga gggggcgca gggcgcgga gaggaggcca tgggcgcgcg cggggcgctg 60
      ctgctggcgc tgctgctggc tcgggctgga ctcaggaagc cggagtcgca ggaggcgcg 120
      cccttatcag gaccatgcgg ccgacgggtc atcacgtcgc gcatcgtggg tggagaggac 180
      gccgaactcg ggcgttggcc gtggcagggg agcctgcgcc tgtgggattc ccacgtatgc 240
      ggagtgagcc tgctcagcca ccgctgggca ctcacggcgg cgcactgctt tgaaacctat 300
40      agtgacctta gtgatccctc egggtggatg gtccagtctg gccagctgac ttccatgcca 360
      tccttctgga gcctgcaggc ctactacacc cgttactctg ttcgaatat ctatctgagc 420
      cctcgtctacc tggggaattc accctatgac attgccttgg tgaagctgtc tgcacctgtc 480
      acctacacta aacacatcca gcccatctgt ctccaggcct ccacatttga gtttgagaac 540
45      eggacagact gctgggtgac tggctggggg tacatcaaag aggatgaggc actgccatct 600
      cccacacccc tccaggaagt tcaggtcgcc atcataaaca actctatgtg caaccacctc 660
      ttctcaagt acagtctccg caaggacatc tttggagaca tggtttgtgc tggcaatgcc 720
      caaggcgggg aggatgcctg cttcggtgac tcaggtggac ccttggcctg taacaagaat 780
50      ggactgtggt atcagattgg agtcgtgagc tggggagtgg gctgtggctg gcccaatcgg 840
      cccggtgtct acaccaatat cagccaccac tttgagtgga tccagaagct gatggcccag 900
      agtggcatgt ccagccaga cccctcctgg cactactct tttcctct tctctgggct 960
      ctcccactcc tggggccggt ctgagcctac ctgagcccat gcagcctggg gccactgcca 1020
55      agtcaggccc tggttctctt ctgtcttctt tggtaataaa cacattccag ttgatgcctg 1080
      c 1081
```

<210> 2  
60 <211> 327  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 267 291 T3

<400> 2

5 Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gln Ala Ala Gly Glu Glu Ala Met Gly Ala  
1 5 10 15

Arg Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Ala Arg Ala Gly Leu Arg  
10 20 25 30

Lys Pro Glu Ser Gln Glu Ala Ala Pro Leu Ser Gly Pro Cys Gly Arg  
15 35 40 45

Arg Val Ile Thr Ser Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ala Glu Leu Gly  
20 50 55 60

Arg Trp Pro Trp Gln Gly Ser Leu Arg Leu Trp Asp Ser His Val Cys  
25 65 70 75 80

Gly Val Ser Leu Leu Ser His Arg Trp Ala Leu Thr Ala Ala His Cys  
30 85 90 95

Phe Glu Thr Tyr Ser Asp Leu Ser Asp Pro Ser Gly Trp Met Val Gln  
35 100 105 110

Phe Gly Gln Leu Thr Ser Met Pro Ser Phe Trp Ser Leu Gln Ala Tyr  
40 115 120 125

Tyr Thr Arg Tyr Phe Val Ser Asn Ile Tyr Leu Ser Pro Arg Tyr Leu  
45 130 135 140

Gly Asn Ser Pro Tyr Asp Ile Ala Leu Val Lys Leu Ser Ala Pro Val  
50 145 150 155 160

Thr Tyr Thr Lys His Ile Gln Pro Ile Cys Leu Gln Ala Ser Thr Phe  
55 165 170 175

Glu Phe Glu Asn Arg Thr Asp Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Ile  
60 180 185 190

Lys Glu Asp Glu Ala Leu Pro Ser Pro His Thr Leu Gln Glu Val Gln  
65 195 200 205

Val Ala Ile Ile Asn Asn Ser Met Cys Asn His Leu Phe Leu Lys Tyr  
210 215 220

Ser Phe Arg Lys Asp Ile Phe Gly Asp Met Val Cys Ala Gly Asn Ala

ES 2 267 291 T3

	225		230		235		240
5	Gln Gly Gly Lys Asp Ala Cys Phe Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ala	245		250		255	
10	Cys Asn Lys Asn Gly Leu Trp Tyr Gln Ile Gly Val Val Ser Trp Gly	260		265		270	
15	Val Gly Cys Gly Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn Ile Ser	275		280		285	
20	His His Phe Glu Trp Ile Gln Lys Leu Met Ala Gln Ser Gly Met Ser	290		295		300	
25	Gln Pro Asp Pro Ser Trp Pro Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu Trp Ala	305		310		315	320
	Leu Pro Leu Leu Gly Pro Val		325				

<202> 3

<211> 5

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

35 Arg Ile Val Gly Gly  
1 5

40

45

50

55

60

65