



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 103**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00903373 .9**

96 Fecha de presentación : **21.01.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1144449**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2001**

54

Título: **Reactivos y métodos útiles para detectar enfermedades de la mama.**

30

Prioridad: **21.01.1999 US 234716**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.07.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.07.2010**

73

Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**  
**One Abbott Park Road**  
**Abbott Park Illinois 60064-3500, US**

72

Inventor/es: **Billing-Medel, Patricia, A.;**  
**Cohen, Maurice;**  
**Colpitts, Tracey, L.;**  
**Friedman, Paula, N.;**  
**Gordon, Julian;**  
**Granados, Edward, N.;**  
**Hodges, Steven, C.;**  
**Klass, Michael, R.;**  
**Kratochvil, Jon, D.;**  
**Russell, John, C. y**  
**Stroupe, Stephen, D.**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 343 103 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

Reactivos y métodos útiles para detectar enfermedades de la mama.

## 5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere en general a la detección de enfermedades de la mama. Además, la invención también se refiere a reactivos y métodos para detectar enfermedades de la mama. Más particularmente, la presente invención se refiere a reactivos tales como secuencias polinucleotídicas, y las secuencias polipeptídicas codificadas por la mismas, así como a métodos que utilizan estas secuencias. Las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas son útiles para detectar, diagnosticar, determinar la fase, controlar, pronosticar, formar imágenes *in vivo*, prevenir o tratar, o determinar la predisposición a enfermedades o afecciones de la mama, tales como el cáncer de mama.

El cáncer de mama es la forma más común de cáncer que se da en mujeres en los Estados Unidos. Se prevé que la incidencia de los cánceres de mama en los Estados Unidos será que se presentarán 180.300 casos diagnosticados y 43.900 muertes relacionadas con cáncer de mama durante 1998 (estadísticas de la Sociedad Americana del Cáncer). En todo el mundo, la incidencia del cáncer de mama ha aumentado de 700.000 en 1985 a aproximadamente 900.000 en 1990. G. N. Hortobagyi *et al.*, CA Cancer J Clin 45: 199-226 (1995).

Los procedimientos usados para detectar, diagnosticar, determinar la fase, controlar, pronosticar, formar imágenes *in vivo*, prevenir o tratar, o determinar la predisposición a enfermedades o afecciones de la mama, tales como cáncer de mama, son de una importancia crítica para el desenlace del paciente. Por ejemplo, los pacientes a los que se les diagnostica cáncer de mama temprano tienen una tasa de supervivencia relativa de cinco años superior al 90% en comparación con una tasa de supervivencia de aproximadamente el 20% para pacientes a los que se les diagnostican cánceres de mama metastatizados en lugares distantes. (Estadísticas de la Sociedad Americana del Cáncer). Actualmente, los mejores indicadores iniciales del cáncer de mama temprano son el examen físico de la mama y la mamografía. J. R. Harris *et al.* En: Cancer: Principles and Practice of Oncology, Cuarta Edición, págs. 1264-1332, Filadelfia, PA: J/B. Lippincott Co. (1993). La mamografía puede detectar un tumor de mama antes de que pueda detectarse por examen físico, pero tiene sus limitaciones. Por ejemplo, el valor predictivo de la mamografía depende de las habilidades del observador y de la calidad del mamograma. Además, del 80 al 93% de los mamogramas sospechosos son falsos positivos y del 10 al 15% de las mujeres con cáncer de mama tienen mamogramas con falsos negativos. C. J. Wright *et al.*, Lancet 346: 29-32 (1995). Claramente son necesarios nuevos métodos de diagnóstico que sean más sensibles y específicos para detectar el cáncer de mama temprano.

Los pacientes con cáncer de mama se controlan de cerca después de la terapia inicial y durante la terapia adyuvante para determinar la respuesta a la terapia y para detectar enfermedad persistente o recidivante, o metástasis distante temprana. Los procedimientos de diagnóstico actuales para controlar el cáncer de mama incluyen la mamografía, la exploración de hueso, radiografías de tórax, el ensayo de la función hepática y ensayos para marcadores en suero. Los marcadores tumorales en suero usados más comúnmente para controlar pacientes son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y CA 15-3. Las limitaciones del CEA incluyen la ausencia de niveles en suero elevados en aproximadamente el 40% de las mujeres con enfermedad metastásica. Además, la elevación del CEA durante la terapia adyuvante puede no estar relacionada con la aparición de recidivas sino con otros factores que no sean clínicamente importantes. El CA 15-3 también puede ser negativo en un número importante de pacientes con enfermedad progresiva y, por lo tanto, no predice la metástasis. Tanto el CEA como el CA 15-3 pueden estar elevados en afecciones benignas no malignas, dando origen a resultados falsos positivos. Por lo tanto, sería clínicamente beneficioso encontrar un marcador asociado a la mama que sea más sensible y específico en la detección de recidivas del cáncer. J. R. Harris *et al.*, anteriormente. M. K. Schwartz, En: Cancer: Principles and Practice of Oncology, Vol. 1, Cuarta Edición, págs. 531 - 542, Filadelfia, PA: J/B. Lippincott Co. 1993.

Otra etapa importante en el tratamiento del cáncer de mama es determinar la fase de la enfermedad del paciente, debido a que la determinación de la fase tiene un valor pronóstico potencial y proporciona criterios para diseñar una terapia óptima. Actualmente, la determinación de la fase patológica del cáncer de mama es preferible sobre la determinación de la fase clínica debido a que la primera proporciona un pronóstico más preciso. J. R. Harris *et al.*, anteriormente. Por otro lado, la determinación de la fase clínica se preferiría cuando fuera al menos tan precisa como la determinación de la fase patológica, ya que no depende de un procedimiento invasivo para obtener tejido para su evaluación patológica. La determinación de la fase del cáncer de mama podría mejorarse detectando nuevos marcadores en suero u orina que podrían diferenciar entre diferentes fases de invasión. Dichos marcadores podrían ser ARNm o marcadores proteicos expresados por células que se originan del tumor primario en la mama pero residen en la sangre, médula ósea o ganglios linfáticos y podrían servir como indicadores sensibles para la metástasis en estos órganos distales. Por ejemplo, se han detectado antígenos proteicos específicos y ARNm asociados con células epiteliales de mama por técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR, respectivamente, en médula ósea, ganglios linfáticos y sangre de pacientes con cáncer de mama que sugieren metástasis. K. Pantel *et al.*, Onkologie 18: 394-401 (1995). Dichos procedimientos de diagnóstico también podrían incluir ensayos inmunológicos basados en la aparición de diversos marcadores de enfermedad en muestras de ensayo tales como sangre, plasma, suero u orina obtenidos por procedimientos mínimamente invasivos que son detectables por procedimientos inmunológicos. Estos procedimientos de diagnóstico proporcionarían información para ayudar al médico en el tratamiento del paciente con enfermedad de la mama, con un coste reducido para el paciente. Existen marcadores tales como el antígeno prostático específico (PSA) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) y se usan clínicamente para explorar pacientes para cáncer de próstata

y cáncer testicular, respectivamente. Por ejemplo, el PSA se secreta normalmente por la próstata a altos niveles en el líquido seminal pero está presente a muy bajos niveles en la sangre de hombres con próstatas normales. Se usan niveles elevados de proteína PSA en suero en la detección temprana del cáncer de próstata o enfermedad en hombres asintomáticos. Véase, por ejemplo, G. E. Hanks *et al.*, En: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Vol. 1, Cuarta Edición, págs. 1073-1113, Filadelfia, PA: J. B. Lippincott Co. 1993. M. K. Schwartz *et al.*, En: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Vol. 1, Cuarta Edición, págs. 531-542, Filadelfia, PA: J. B. Lippincott Co. 1993. Asimismo, el tratamiento de las enfermedades de la mama podría mejorarse mediante el uso de nuevos marcadores que se expresen de forma normal en la mama pero se encuentren en cantidades elevadas en un compartimento corporal inapropiado como resultado de la enfermedad de la mama.

Además, nuevos marcadores que pudieran predecir el comportamiento biológico de los cánceres de mama tempranos también serían de un valor importante. Los cánceres de mama tempranos que amenazan o amenazarán la vida del paciente son más clínicamente importantes que los que no suponen o no supondrán una amenaza, G. E. Hanks, anteriormente. Dichos marcadores son necesarios para predecir qué pacientes con ganglios linfáticos histológicamente negativos sufrirán recidivas de cáncer y también predecir qué casos de carcinoma ductal *in situ* se desarrollarán hacia carcinoma de mama invasivo. Marcadores de pronóstico más precisos permitirían al clínico identificar con precisión cánceres tempranos localizados en la mama que progresarán y metastatizarán si no se tratan de forma agresiva. Además, la ausencia de un marcador para un cáncer agresivo en el paciente podría evitar al paciente un tratamiento costoso y no beneficioso. J. R. Harris *et al.*, anteriormente. E. R. Frykberg *et al.*, *Cancer* 74: 350-361 (1994).

Por lo tanto, sería ventajoso proporcionar métodos y reactivos específicos útiles para detectar, diagnosticar, determinar la fase, controlar, pronosticar, formar imágenes *in vivo*, prevenir o tratar, o determinar la predisposición a enfermedades o afecciones de la mama. Dichos métodos incluirían el ensayo de una muestra de ensayo para determinar productos de un gen que esté sobreexpresado en enfermedades y afecciones asociadas con la mama, incluyendo cáncer. Dichos métodos también pueden incluir el ensayo de una muestra de ensayo para determinar productos de un gen que se han alterado por la enfermedad o afección asociada con la mama, incluyendo el cáncer. Dichos métodos pueden incluir además el ensayo de una muestra de ensayo para productos de un gen cuya distribución entre los diversos tejidos y compartimentos del cuerpo se haya alterado por una enfermedad o afección asociada con la mama, incluyendo el cáncer. Dichos métodos comprenderían la generación de ADNc a partir de ARNm en la muestra de ensayo, la amplificación, cuando sea necesario, de porciones del ADNc correspondiente al gen o un fragmento del mismo, y la detección del producto de ADNc como un indicio de la presencia de la enfermedad o afección incluyendo cáncer o la detección de productos de traducción de los ARNm que comprenden secuencias génicas como un indicio de la presencia de la enfermedad. Los reactivos útiles incluyen un polinucleótido o polinucleótidos o fragmento o fragmentos de los mismos que pueden usarse en métodos de diagnóstico tales como reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), PCR, o ensayos de hibridación de ARNm extraído de tejido de biopsia, sangre u otras muestras de ensayo; o proteínas que son los productos de traducción de dichos ARNm; o anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. Dichos ensayos incluirían métodos para ensayar una muestra para determinar un producto o productos del gen y detectar el producto o productos como un indicio de enfermedad de la mama. El tratamiento con fármacos o la terapia génica para enfermedades y afecciones de la mama incluyendo el cáncer puede basarse en estas secuencias génicas identificadas o sus proteínas expresadas y la eficacia de cualquier terapia particular puede controlarse. Además, sería ventajoso tener métodos de diagnóstico no quirúrgicos alterativos disponibles capaces de detectar un cáncer de mama en fase temprana, tal como cáncer.

Al contrario que la traducción convencional de ARNm en polipéptidos, se han descrito errores raros en la traducción denominados desplazamiento de la fase de lectura en la traducción que dan como resultado un polipéptido contiguo codificado por dos fases de lectura diferentes (P. J. Farabaugh, *Annual Rev. Genet.* 30: 507-528 (1996)).

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método de detección de un cáncer de mama en un individuo por detección de un polinucleótido de BS322 diana en una muestra de ensayo que comprende poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un oligonucleótido específico de BS322 y detectar la presencia del polinucleótido de BS322 diana en la muestra de ensayo, en el que la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces. El oligonucleótido específico de BS322 tiene una longitud de 15 a 50 nucleótidos y una identidad de al menos el 90% con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N°: 1, SECUENCIA ID N°: 2, SECUENCIA ID N°: 3, SECUENCIA ID N°: 4, SECUENCIA ID N°: 5, SECUENCIA ID N°: 6, SECUENCIA ID N°: 7, SECUENCIA ID N°: 8 y SECUENCIA ID N°: 9 (SECUENCIAS ID N°: 1-9), y complementarias de las mismas. Además, el oligonucleótido específico de BS322 puede unirse a una fase sólida antes de realizarse el método.

La presente invención también proporciona un método para detectar cáncer de mama en un individuo por detección de ARNm de BS322 en una muestra de ensayo que comprende (a) realizar una transcripción inversa (RT) con al menos un cebador para producir ADNc, (b) amplificar el ADNc así obtenido usando oligonucleótidos de BS322 como cebadores sentido y antisentido para obtener el amplicón de BS322, y detectar la presencia del amplicón de BS322 como un indicio de la presencia de ARNm de BS322 en la muestra de ensayo, donde los oligonucleótidos de BS322 utilizados en las etapas (a) y (b) tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y tienen una identidad de al menos el 90% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N°: 1-9 y complementarias de

## ES 2 343 103 T3

las mismas, en el que la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces. La amplificación puede realizarse por la reacción en cadena de la polimerasa. Además, la muestra de ensayo puede hacerse reaccionar con una fase sólida antes de la realización del método, antes de la amplificación o antes de la detección. Esta reacción puede ser una reacción directa o indirecta. Además, la etapa de detección puede comprender utilizar un marcador detectable capaz de generar una señal medible. El marcador detectable puede unirse a una fase sólida.

La presente invención proporciona además un método de detección de cáncer de mama en un individuo por detección de un polinucleótido de BS322 diana en una muestra de ensayo sospechosa de contener polinucleótidos de BS322 diana que comprende (a) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un oligonucleótido de BS322 como cebador sentido y al menos un oligonucleótido de BS322 como cebador antisentido, y amplificar el mismo para obtener un producto de reacción de primera fase; (b) poner en contacto el producto de reacción de primera fase con al menos otro oligonucleótido de BS322 para obtener un producto de reacción de segunda fase con la condición de que el otro oligonucleótido de BS322 se localice 3' a los oligonucleótidos de BS322 utilizados en la etapa (a) y sea complementario al producto de reacción de primera fase; y (c) detectar el producto de reacción de segunda fase como un indicio de la presencia de un polinucleótido de BS322 diana en la muestra de ensayo, en el que la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces. Los oligonucleótidos de BS322 seleccionados como reactivos en las etapas (a) y (b) en el método tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y una identidad de al menos el 90% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N°: 1-9 y complementarias de las mismas. La amplificación puede realizarse por la reacción en cadena de la polimerasa. La muestra de ensayo puede hacerse reaccionar directa o indirectamente con una fase sólida antes de realizar el método, o antes de la amplificación o antes de la detección. La etapa de detección también comprende utilizar un marcador detectable capaz de generar una señal medible; además, el marcador detectable puede unirse a una fase sólida.

También se proporcionan kits de ensayo útiles para detectar el cáncer de mama en un individuo por detección de polinucleótido de BS322 diana en una muestra de ensayo que comprenden un recipiente que contiene al menos un polinucleótido específico de BS322 que tiene una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tiene una identidad de al menos el 90% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N°: 1-9 y complementarias de las mismas. Estos kits de ensayo comprenden además recipientes con herramientas útiles para recoger muestras de ensayo (tales como, por ejemplo, sangre, orina, saliva y heces). Dichas herramientas incluyen lancetas y papel o paño absorbente para recoger y estabilizar sangre; hisopos para recoger y estabilizar saliva; y cubetas para recoger y estabilizar muestras de orina o heces. Los materiales de recogida, tales como papeles, paños, hisopos, cubetas y similares pueden tratarse opcionalmente para evitar la desnaturalización o la adsorción irreversible de la muestra. Los materiales de recogida también pueden tratarse con o contener conservantes, estabilizantes o agentes antimicrobianos para ayudar a mantener la integridad de las muestras.

La presente invención también proporciona un polinucleótido purificado o fragmento del mismo derivado de un gen de BS322. El polinucleótido purificado es capaz de hibridar de forma selectiva con el ácido nucleico del gen de BS322 o un complementario del mismo. El polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en un polinucleótido que tiene una longitud de 15 nucleótidos hasta el número de nucleótidos en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N°: 1-9 y complementarias de las mismas, y que tiene una identidad de al menos el 90% con dicha secuencia o complementaria de la misma. Además, el polinucleótido purificado puede producirse por técnicas recombinantes y/o sintéticas. El polinucleótido recombinante purificado puede estar contenido dentro de un vector recombinante. La invención comprende además una célula huésped transfectada con el vector recombinante.

La presente invención proporciona además un sistema de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que incluye una fase de lectura abierta derivada de BS322. La secuencia de ácido nucleico tiene una longitud de 15 nucleótidos hasta el número de nucleótidos en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N°: 1-9 y complementarias de las mismas, y tiene una identidad de al menos el 90% con dicha secuencia o complementaria de la misma. La secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia de control compatible con un huésped deseado. También se proporciona una célula transfectada con este sistema de expresión recombinante.

La presente invención también proporciona un polipéptido codificado por BS322. El polipéptido puede producirse por tecnología recombinante, proporcionarse en forma purificada o producirse por técnicas sintéticas. El polipéptido tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N°: 24, SECUENCIA ID N°: 25, SECUENCIA ID N°: 26, SECUENCIA ID N°: 27 y SECUENCIA ID N°: 28.

También se proporciona una molécula de unión específica, que es un anticuerpo, que se une específicamente a al menos un epítipo de BS322. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. El epítipo es de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N°: 24, SECUENCIA ID N°: 25, SECUENCIA ID N°: 26, SECUENCIA ID N°: 27 y SECUENCIA ID N°: 28. También se incluyen kits de ensayo para determinar la presencia de antígeno BS322 o anticuerpo anti-BS322 en una muestra de ensayo. En una realización, los kits de ensayo comprenden un recipiente que contiene al menos un polipéptido BS322 como se ha

## ES 2 343 103 T3

definido anteriormente. Además, el kit de ensayo puede comprender un recipiente con herramientas útiles para recoger muestras de ensayo (tales como sangre, orina, saliva y heces). Dichas herramientas incluyen lancetas y papel o paño absorbente para recoger y estabilizar sangre; hisopos para recoger y estabilizar saliva; y cubetas para recoger y estabilizar muestras de orina o heces. Los materiales de recogida tales como papeles, paños, hisopos, cubetas y similares pueden tratarse opcionalmente para evitar la desnaturalización o la adsorción irreversible de la muestra. Estos materiales de recogida también pueden tratarse con o contener conservantes, estabilizantes o agentes antimicrobianos para ayudar a mantener la integridad de las muestras. Además, el polipéptido puede estar unido a una fase sólida.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos contra el antígeno BS322 pueden usarse para detectar o formar una imagen de la localización del antígeno en un paciente con el fin de detectar o diagnosticar una enfermedad o afección. Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales o generarse por técnicas de biología molecular y pueden marcarse con una diversidad de marcadores detectables incluyendo, pero sin limitación, radioisótopos y metales paramagnéticos. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos, ya sean monoclonales, policlonales o generados por técnicas de biología molecular, pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la expresión del antígeno BS322. En el caso de aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo puede usarse sin derivatización o puede derivatizarse con un agente citotóxico tal como un radioisótopo, enzima, toxina, fármaco, profármaco o similar.

Otro kit de ensayo para determinar la presencia de antígeno BS322 o anticuerpo anti-BS322 en una muestra de ensayo comprende un recipiente que contiene un anticuerpo como se ha definido anteriormente que se une específicamente a un antígeno BS322, en el que el antígeno BS322 comprende al menos un epítipo codificado por BS322. Estos kits de ensayo pueden comprender además recipientes con herramientas útiles para recoger muestras de ensayo (tales como sangre, orina, saliva y heces). Dichas herramientas incluyen lancetas y papel o paño absorbente para recoger y estabilizar sangre; hisopos para recoger y estabilizar saliva; cubetas para recoger y estabilizar muestras de orina o heces. Los materiales de recogida tales como papeles, paños, hisopos, cubetas y similares pueden tratarse opcionalmente para evitar la desnaturalización o la adsorción irreversible de la muestra. Estos materiales de recogida también pueden tratarse con o contener conservantes, estabilizantes o agentes antimicrobianos para ayudar a mantener la integridad de las muestras. El anticuerpo puede unirse a una fase sólida.

Se proporciona un método para producir un polipéptido que contiene al menos un epítipo de BS322, comprendiendo dicho método incubar células huésped transfectadas con un vector de expresión. Este vector comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos de BS322 seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28.

También se proporciona un método para detectar cáncer de mama en un individuo por detección de antígeno BS322 en una muestra de ensayo sospechosa de contener antígeno BS322. El método comprende poner en contacto la muestra de ensayo con un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a al menos un epítipo del antígeno BS322 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos de antígeno/anticuerpo; y detectar la presencia de dichos complejos que contienen el anticuerpo como un indicio de la presencia de antígeno BS322 en la muestra de ensayo, donde la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces. El anticuerpo puede unirse a una fase sólida y puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. Además, el anticuerpo se une específicamente a al menos un antígeno BS322 seleccionado del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28, y fragmentos de las mismas que tienen al menos 15-20 aminoácidos.

Se proporciona otro método que detecta cáncer de mama en un individuo por detección de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno BS322 en una muestra de ensayo sospechosa de contener estos anticuerpos. El método comprende poner en contacto la muestra de ensayo con un polipéptido que contiene al menos un epítipo de BS322, en el que el epítipo de BS322 es de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de BS322 y que se selecciona del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28, en el que la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces. El contacto se realiza durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que se formen complejos de antígeno/anticuerpo. El método implica además detectar complejos que contienen el polipéptido. El polipéptido puede unirse a una fase sólida. Además, el polipéptido puede ser una proteína recombinante o un péptido sintético.

La presente invención proporciona una célula transfectada con una secuencia de ácido nucleico de BS322 que codifica al menos un epítipo de un antígeno BS322. La secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N°: 1-9, complementarias de las mismas y fragmentos de dichas secuencias que tienen al menos 15 nucleótidos.

## ES 2 343 103 T3

Pueden producirse anticuerpos contra el antígeno BS322 mediante un método que comprende administrar a un individuo un polipéptido inmunogénico aislado, en el que el polipéptido inmunogénico aislado comprende al menos un epítipo de BS322. El polipéptido inmunogénico se administra en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune. El polipéptido inmunogénico aislado comprende al menos 15-20 aminoácidos y tiene una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28.

Se describe otro método para producir anticuerpos que se unen específicamente al antígeno BS322, comprendiendo dicho método administrar a un individuo un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un epítipo de BS322 de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28, y fragmentos de las mismas que tienen al menos 15-20 aminoácidos. El plásmido se administra en una cantidad tal que el plásmido se capta por células en el individuo y se expresa a niveles suficientes para producir una respuesta inmune.

También se proporciona una composición de materia que comprende un polinucleótido de BS322 que tiene una longitud desde 15 nucleótidos hasta el número de nucleótidos en un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N°: 1-9 y complementarias de las mismas, y que tiene una identidad de al menos el 90% con dicha secuencia o complementaria de la misma. El polinucleótido de BS322 codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un epítipo de BS322. Otra composición de materia proporcionada por la presente invención comprende un polipéptido con al menos un epítipo de BS322 de aproximadamente 8-10 aminoácidos. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28. También se proporciona un gen o fragmento del mismo que codifica un polipéptido BS322 que tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con la SECUENCIA ID N° 24 o SECUENCIA ID N° 25, y un gen o un fragmento del mismo que comprende ADN que tiene una longitud desde 15 nucleótidos hasta el número de nucleótidos en una secuencia seleccionada de la SECUENCIA ID N° 8 y SECUENCIA ID N° 9 y que tiene una identidad de al menos el 90% con dicha secuencia o complementaria de la misma.

### 30 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1E muestran el alineamiento de nucleótidos de los clones 4304443H1 (SECUENCIA ID N° 1), 3040232H1 (SECUENCIA ID N° 2), 3790941H1 (SECUENCIA ID N° 3), 3424294H1 (SECUENCIA ID N° 4), 2741038H1 (SECUENCIA ID N° 5), 4302934H1 (SECUENCIA ID N° 6), 158345H1 (SECUENCIA ID N° 7), la secuencia de longitud completa del clon 4304443H1 [denominada 4304443inh (SECUENCIA ID N° 8)], y la secuencia consenso (SECUENCIA ID N° 9) derivada de la misma.

La Figura 2 muestra el mapa de contigios que representa la formación de la secuencia de nucleótidos consenso (SECUENCIA ID N° 9) del alineamiento de nucleótidos de clones solapantes 4304443H1 (SECUENCIA ID N° 1), 3040232H1 (SECUENCIA ID N° 2), 3790941H1 (SECUENCIA ID N° 3), 3424294H1 (SECUENCIA ID N° 4), 2741038H1 (SECUENCIA ID N° 5), 4302934H1 (SECUENCIA ID N° 6), 158545H1 (SECUENCIA ID N° 7), 4304443inh (SECUENCIA ID N° 8).

### 45 Descripción detallada de la invención

Diversas realizaciones de la invención se han descrito anteriormente y se definen en las reivindicaciones adjuntas 1-20, así como en la descripción detallada de la invención siguiente.

La presente invención proporciona un gen o un fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente, que codifica un polipéptido BS322 que tiene una identidad de al menos el 85% con la SECUENCIA ID N° 24 o SECUENCIA ID N° 25. La presente invención incluye además un gen de BS322 o un fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente, que comprende un ADN que tiene una identidad de al menos el 90% con la SECUENCIA ID N° 8 o SECUENCIA ID N° 9.

La presente invención también proporciona métodos para ensayar una muestra de ensayo para determinar productos de un gen de tejido mamario denominado BS322, que comprende generar ADNc a partir de ARNm en la muestra de ensayo y detectar el ADNc como un indicio de la presencia del gen de tejido mamario BS322. El método puede incluir una etapa de amplificación, en la que una o más porciones del ARNm de BS322 que se corresponden con el gen o fragmentos del mismo se amplifican. También se proporcionan métodos para ensayar para los productos de traducción de BS322. Las muestras de ensayo que pueden ensayarse por los métodos proporcionados en el presente documento incluyen tejidos, células, fluidos corporales y secreciones. La presente invención también proporciona reactivos tales como cebadores oligonucleotídicos y polipéptidos que son útiles en la realización de estos métodos.

Las porciones de las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento son útiles como cebadores para la transcripción inversa de ARN o para la amplificación de ADNc o como sondas para determinar la presencia de ciertas secuencias de ARNm en muestras de ensayo. También se describen secuencias de ácido nucleico que permiten la producción de secuencias polipeptídicas codificadas que son útiles como patrones o reactivos en inmunoensayos de diagnóstico, como dianas para ensayos de exploración farmacéutica y/o como componentes o como sitios diana

## ES 2 343 103 T3

para diversas terapias. Los anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra al menos un epítipo contenido en estas secuencias polipeptídicas son útiles como agentes de administración para agentes terapéuticos, así como para ensayos de diagnóstico y para la exploración de enfermedades o afecciones asociadas con BS322, especialmente cáncer de mama. El aislamiento de secuencias de otras porciones del gen de interés puede lograrse utilizando sondas o cebadores de PCR derivados de estas secuencias de ácido nucleico. Esto permite que se establezcan sondas adicionales del ARNm o ADNc de interés, así como las secuencias polipeptídicas codificadas correspondientes. Estas moléculas adicionales son útiles en la detección, diagnóstico, determinación de fase, control, pronóstico, formación de imágenes *in vivo*, prevención o tratamiento, o determinación de la predisposición a enfermedades y afecciones de la mama, tales como cáncer de mama, caracterizadas por BS322, como se describe en este documento.

Las composiciones y métodos descritos en este documento permitirán la identificación de ciertos marcadores como indicativos de una enfermedad o afección de tejido mamario; la información obtenida a partir de los mismos ayudará a la detección, diagnóstico, determinación de fase, control, pronóstico, formación de imágenes *in vivo*, prevención o tratamiento, o determinación de enfermedades o afecciones asociadas con BS322, especialmente cáncer de mama. Los métodos de ensayo incluyen, por ejemplo, ensayos de sonda que utilizan la secuencia o secuencias proporcionadas en este documento y que también pueden utilizar métodos de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la hibridación.

Además, las secuencias de nucleótidos proporcionadas en este documento contienen fases de lectura abierta a partir de las que puede encontrarse un epítipo inmunogénico. Se cree que este epítipo es único para la patología o afección asociada con BS322. También se cree que los polinucleótidos o polipéptidos y proteínas codificadas por el gen de BS322 son útiles como marcador. Este marcador está elevado en una enfermedad tal como cáncer de mama, alterado en una enfermedad tal como cáncer de mama o presente como una proteína normal pero que aparece en un compartimento corporal inapropiado. La singularidad del epítipo puede determinarse por (i) su reactividad inmunológica y especificidad con anticuerpos dirigidos contra proteínas y polipéptidos codificados por el gen de BS322 y (ii) su no reactividad con cualquier otro marcador tisular. Son bien conocidos los métodos para determinar la reactividad inmunológica e incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), hemaglutinación (HA), inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) y otros. Se describen en este documento varios ejemplos de métodos adecuados.

A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

Un polinucleótido “derivado de” o “específico para” una secuencia designada se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia contigua de al menos aproximadamente 15-20 nucleótidos o cualquier número entero entre los intervalos identificados anteriormente, que se corresponde, es decir, es idéntica o complementaria a, una región de la secuencia de nucleótidos designada. La secuencia puede ser complementaria o idéntica a una secuencia que es única para una secuencia polinucleotídica particular según se determina por procedimientos conocidos en la técnica. Pueden usarse, por ejemplo, comparaciones con secuencias en bancos de datos como un método para determinar la singularidad de una secuencia designada. Las regiones de las que pueden proceder las secuencias incluyen, pero sin limitación, regiones que codifican epítipos específicos, así como regiones no traducidas y/o no transcritas.

El polinucleótido derivado no se procederá necesariamente físicamente de la secuencia de nucleótidos de interés bajo estudio, sino que puede generarse de cualquier forma incluyendo, pero sin limitación, síntesis química, replicación, transcripción inversa o transcripción, que se basa en la información proporcionada por la secuencia de bases en la región o regiones de las que procede el polinucleótido. Como tal, puede representar una orientación sentido o antisentido del polinucleótido original. Además, pueden modificarse combinaciones de regiones correspondientes a las de la secuencia designada de formas conocidas en la técnica para que concuerden con el uso deseado.

Un “fragmento” de un polinucleótido especificado se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia contigua de al menos aproximadamente 15-20 nucleótidos, preferiblemente 25-50 nucleótidos o cualquier número entero entre los intervalos designados anteriormente, correspondiente, es decir, idéntica o complementaria a, una región de la secuencia de nucleótidos especificada. Si el polinucleótido codifica un fragmento polipeptídico, la longitud del fragmento polinucleotídico será del número de pares de bases necesario para codificar el fragmento polipeptídico de interés. Se proporcionan a continuación longitudes de fragmentos polipeptídicos representativas. Por lo tanto, se incluyen en la presente invención polinucleótidos que codifican estos fragmentos polipeptídicos.

El término “cebador” denota una secuencia oligonucleotídica específica que es complementaria a una secuencia de nucleótidos diana y usada para hibridar con la secuencia de nucleótidos diana. Un cebador sirve como punto de inicio para la polimerización de nucleótidos catalizada por una ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa.

El término “sonda” denota un segmento de ácido nucleico definido que puede usarse para identificar un polinucleótido específico presente en muestras que llevan la secuencia complementaria.

La expresión “codificado por” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica, en la que la secuencia polipeptídica o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 15-20 aminoácidos o cualquier número entero entre el intervalo especificado anteriormente, a partir de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

## ES 2 343 103 T3

También se incluyen secuencias polipeptídicas que son inmunológicamente identificables con un polipéptido codificado por la secuencia. Por lo tanto, una secuencia “polipeptídica”, “proteica” o “de aminoácidos” tiene una identidad de al menos el 85% y, más preferiblemente, una identidad de aproximadamente el 90-95% o más o cualquier % de identidad entre los intervalos especificados anteriormente, con una secuencia de aminoácidos de BS322. Esta secuencia de aminoácidos de BS322 puede seleccionarse del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28 y fragmentos de las mismas.

Un “polipéptido recombinante”, “proteína recombinante” o “un polipéptido producido por técnicas recombinantes”, pudiendo dichos términos usarse indistintamente en este documento, describe un polipéptido que en virtud de su origen o manipulación no está asociado con toda o una porción del polipéptido con el que está asociado en la naturaleza y/o está unido a un polipéptido distinto de aquel con el que se une en la naturaleza. Un polipéptido o proteína recombinante o codificada no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. También puede generarse de cualquier forma, incluyendo síntesis química o expresión de un sistema de expresión recombinante.

La expresión “péptido sintético”, como se usa en este documento, se refiere a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud que puede sintetizarse químicamente por métodos bien conocidos por el experto habitual. Estos péptidos sintéticos son útiles en diversas aplicaciones.

El término “polinucleótido”, como se usa en este documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Este término se refiere sólo a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, el término incluye ADN bicatenario y monocatenario, así como ARN bicatenario y monocatenario. También incluye modificaciones, tales como metilación o protección con caperuza, y formas no modificadas del polinucleótido. Los términos “polinucleótido”, “oligómero”, “oligonucleótido” y “oligo” se usan indistintamente en este documento.

“Una secuencia correspondiente a un ADNc” significa que la secuencia contiene una secuencia polinucleotídica que es idéntica o complementaria a una secuencia en el ADN designado. El grado (o “porcentaje”) de identidad o complementariedad con el ADNc será de al menos el 90% o superior. La secuencia que corresponde al ADNc identificado será de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, preferiblemente de al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud y, más preferiblemente, de al menos aproximadamente 70 nucleótidos de longitud. La correspondencia entre el gen o fragmento génico de interés y el ADNc puede determinarse por métodos conocidos en la técnica e incluye, por ejemplo, una comparación directa del material secuenciado con los ADNc descritos o hibridación y digestión con nucleasas de cadena sencilla, seguida de la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

Se conocen bien en la técnica procedimientos para determinar la identidad de secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos e incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (habitualmente por medio de un intermedio de ADNc) y determinar la secuencia de aminoácidos codificada por la misma y comparar ésta con una segunda secuencia de aminoácidos. En general, la “identidad” se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, respectivamente.

Dos o más secuencias polinucleotídicas pueden compararse determinando su “porcentaje de identidad”. Dos o más secuencias de aminoácidos pueden compararse asimismo determinando su “porcentaje de identidad”. El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o peptídicas, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Se proporciona un alineamiento aproximado para secuencias de ácido nucleico mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981). Este algoritmo puede ampliarse para usarse con secuencias peptídicas usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 supl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., Estados Unidos, y normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763 (1986). Se proporciona una puesta en práctica de este algoritmo para secuencias de ácido nucleico y peptídicas por el Genetics Computer Group (Madison, WI) en su aplicación de utilidad BestFit: Los parámetros por defecto para este método se describen en el Manual del Programa Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (1995) (disponible en el Genetics Computer Group, Madison, WI). Otros programas igualmente adecuados para calcular el porcentaje de identidad entre secuencias se conocen en general en la técnica.

Por ejemplo, puede determinarse el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular con una secuencia de referencia usando el algoritmo de homología Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por huecos de seis posiciones de nucleótidos. Otro método de establecimiento del porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es el uso del paquete de programas MPSRCH de derechos registrados por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de esta serie de paquetes, puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman cuando se usan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de huecos de 12, penalización por extensión de huecos de uno y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor “Coincidencia” refleja la “identidad de secuencia”. Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias se conocen en general en la técnica, tales como el programa de alineamiento BLAST, que también puede usarse con parámetros por defecto. Por ejemplo, puede usarse BLASTN y BLASTP con los parámetros

## ES 2 343 103 T3

por defecto siguientes: código genético = convencional; filtro = ninguno; cadena = ambas; límite = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; búsqueda por = MAYOR PUNTUACIÓN; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Pueden encontrarse detalles de estos programas en la dirección de internet siguiente: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente los parámetros de búsqueda apropiados a usar para una secuencia dada en los programas anteriores. Por ejemplo, los parámetros de búsqueda pueden variar basándose en el tamaño de la secuencia en cuestión. Por lo tanto, por ejemplo, una realización de la presente invención representativa incluiría un polinucleótido de BS322 aislado que tiene X nucleótidos contiguos, en el que (i) los X nucleótidos contiguos tienen una identidad de al menos aproximadamente el 90% con Y nucleótidos contiguos derivados de cualquiera de las SEC ID N° 1-9, (ii) X equivale a Y y (iii) X es superior a o igual a 15-20 nucleótidos y de hasta 5000 nucleótidos, y aún más preferiblemente desde 15-20 nucleótidos hasta el número de nucleótidos presentes en la secuencia de BS322 de longitud completa descrita en este documento, incluyendo todos los valores de números enteros que se incluyen entre los intervalos descritos anteriormente.

La expresión “polinucleótido purificado” se refiere a un polinucleótido de interés o fragmento del mismo que está esencialmente libre, por ejemplo, contiene menos de aproximadamente el 50%, preferiblemente menos de aproximadamente el 70% y, más preferiblemente, menos de aproximadamente el 90% de la proteína con la que se asocia el polinucleótido de forma natural. Son bien conocidos en la técnica procedimientos para purificar polinucleótidos de interés e incluyen, por ejemplo, rotura de la célula que contiene el polinucleótido con un agente caotrópico y separación del polinucleótido o polinucleótidos y proteínas por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación de acuerdo con la densidad.

Las expresiones “polipéptido purificado” o “proteína purificada” se refieren a un polipéptido de interés o fragmento del mismo que está esencialmente libre de, por ejemplo, contiene menos de aproximadamente el 50%, preferiblemente menos de aproximadamente el 70% y más preferiblemente menos de aproximadamente el 90% de componentes celulares con los que el polipéptido de interés está asociado de forma natural. Se conocen en la técnica métodos para purificar polipéptidos de interés.

El término “aislado” significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o ADN o polipéptido, que está separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dicho polinucleótido podría ser parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido podría ser parte de una composición y todavía estar aislado en el sentido de que el vector o composición no son parte de su entorno natural.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente en este documento e indican al menos una cadena molecular de aminoácidos unidos por medio de enlaces covalentes y/o no covalentes. Los términos no se refieren a una longitud de producto específica. Por lo tanto, se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas dentro de la definición de polipéptido. Los términos incluyen modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Además, se incluyen fragmentos proteicos, análogos, proteínas mutadas o variantes, proteínas de fusión y similares dentro del significado de polipéptido.

Un “fragmento” de un polipéptido especificado se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 15-20 aminoácidos derivados del polipéptido especificado.

Las “células huésped recombinantes”, “células huésped”, “células”, “líneas celulares”, “cultivos celulares” y otras expresiones de este tipo que denotan microorganismos o líneas celulares eucariotas superiores cultivadas como entidades unicelulares se refieren a células que pueden usarse o que se han usado como destinatarias para un vector recombinante u otro ADN transferido, e incluyen la progenie original de la célula original que se ha transfectado.

Como se usa en este documento, el término “replicón” se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, un cromosoma o un virus, que se comporta como una unidad de replicación de polinucleótido autónoma dentro de una célula.

Un “vector” es un replicón en el que se une otro segmento polinucleotídico tal como para provocar la replicación y/o expresión del segmento unido.

La expresión “secuencia de control” se refiere a una secuencia polinucleotídica que es necesaria para efectuar la expresión de una secuencia codificante a la que está ligada. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariontes, dichas secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión al ribosoma y terminadores; en eucariotes, dichas secuencias de control incluyen generalmente promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores. La expresión “secuencia de control” pretende incluir por lo tanto como mínimo todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias líder.

## ES 2 343 103 T3

La expresión “unida operativamente” se refiere a una situación en la que los componentes descritos están en una relación que los permite funcionar de su manera deseada. Por lo tanto, por ejemplo, una secuencia de control “unida operativamente” a una secuencia codificante está ligada de tal forma que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con la secuencia de control.

La expresión “fase de lectura abierta” u “ORF” se refiere a una región de una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido. Esta región puede representar una porción de una secuencia codificante o una secuencia codificante total. Pueden ocurrir errores raros en la traducción, denominados desplazamiento de la fase de lectura en la traducción o desplazamiento de la fase de lectura programado, que permiten al ribosoma traducir dos fases de lectura parcialmente solapantes como un solo polipéptido I. P. Ivanovetal. RNA 4(10): 1230-1238 (1998); y P. J. FarabaughAnnu Rev Genet 30: 507-528 (1996). El BS322 contiene dos ORF parcialmente solapantes sin sitio de entrada al ribosoma independiente para la segunda ORF. Por lo tanto, la presente invención contempla la traducción de ORF solapantes como un solo polipéptido.

Una “secuencia codificante” es una secuencia polinucleotídica que se transcribe en ARNm y se traduce en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio de la traducción en el extremo terminal 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo terminal 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, ARNm ADNc y secuencias polinucleotídicas recombinantes.

La expresión “inmunológicamente identificable con/como” se refiere a la presencia del epítipo o epítipos y polipéptido o polipéptidos que también están presentes en y son únicos para el polipéptido o polipéptidos designados. La identidad inmunológica puede determinarse por unión a anticuerpo y/o competición en la unión. Estas técnicas son conocidas para el experto habitual y también se describen en este documento. La singularidad de un epítipo también puede determinarse mediante búsquedas por ordenador de bancos de datos conocidos tales como GenBank, para la secuencia polinucleotídica que codifica el epítipo, y por comparaciones de secuencias de aminoácidos con otras proteínas conocidas.

Como se usa en este documento, el término “epítipo” se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido o proteína. Es posible que un epítipo comprenda tres aminoácidos en una conformación espacial que sea única para el epítipo. Generalmente, un epítipo consiste en al menos cinco de dichos aminoácidos y, más habitualmente, consiste en al menos de ocho a diez aminoácidos. Se conocen en la técnica procedimientos de examen de la conformación espacial e incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

Un “epítipo conformacional” es un epítipo que está compuesto por una yuxtaposición específica de aminoácidos en una estructura inmunológicamente reconocible, estando dichos aminoácidos presentes en el mismo polipéptido en un orden contiguo o no contiguo, o presentes en polipéptidos diferentes.

Un polipéptido es “inmunológicamente reactivo” con un anticuerpo cuando se une el anticuerpo debido al reconocimiento de anticuerpo de un epítipo específico contenido dentro del polipéptido. La reactividad inmunológica puede determinarse por unión a anticuerpo, más particularmente por la cinética de unión a anticuerpo y/o por competición en la unión usando como competidor o competidores un polipéptido o polipéptidos conocidos que contienen un epítipo contra el que se dirige el anticuerpo. Los métodos para determinar si un polipéptido es inmunológicamente reactivo con un anticuerpo se conocen en la técnica.

Como se usa en este documento, la expresión “polipéptido inmunogénico que contiene un epítipo de interés” se refiere a polipéptido de interés de origen natural o fragmentos de los mismos, así como a polipéptidos preparados por otros medios, por ejemplo, por síntesis química, o a la expresión del polipéptido en un organismo recombinante.

El término “transfección” se refiere a la introducción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped procarionota o eucariota independientemente del método usado para la introducción. El término “transfección” se refiere a la introducción tanto estable como transitoria del polinucleótido e incluye la captación directa de polinucleótidos, la transformación, la transducción y la conjugación f. Una vez introducido en la célula huésped, el polinucleótido exógeno puede mantenerse como un replicón no integrado, por ejemplo, un plásmido, o como alternativa puede integrarse en el genoma del huésped.

El “tratamiento” se refiere a la profilaxis y/o terapia.

El término “individuo”, como se usa en este documento, se refiere a vertebrados, particularmente miembros de las especies de mamíferos e incluye, pero sin limitación, animales domésticos, animales deportivos, primates y seres humanos; más particularmente, el término se refiere a seres humanos.

La expresión “cadena sentido” o “cadena positiva” (o “+”) como se usa en este documento denota un ácido nucleico que contiene la secuencia que codifica el polipéptido. La expresión “cadena antisentido” o “cadena negativa” (o “-”) denota un ácido nucleico que contiene una secuencia que es complementaria a la cadena “positiva”.

## ES 2 343 103 T3

La expresión “muestra de ensayo”, como se ha descrito anteriormente, se refiere a un componente del cuerpo de un individuo que es la fuente del analito (tal como anticuerpos e interés o antígenos de interés). Estos componentes son bien conocidos en la técnica. Una muestra de ensayo es típicamente cualquiera sospechosa de contener una secuencia diana. Pueden prepararse muestras de ensayo usando metodologías bien conocidas en la técnica, tal como por obten-  
5 ción de una muestra a partir de un individuo y, si es necesario, alteración de cualquier célula contenida por la misma para liberar los ácidos nucleicos diana. Estas muestras de ensayo son muestras biológicas que pueden ensayarse por los métodos de la presente invención descritos en este documento y son fluidos corporales humanos y animales seleccionados de sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos y diversas secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas,  
10 saliva y heces.

La expresión “producto purificado” se refiere a una preparación del producto que se ha aislado de los constituyentes celulares con los que el producto se asocia normalmente y de otros tipos de células que pueden estar presentes en la muestra de interés.

El término “analito”, como se usa en este documento, es la sustancia a detectar como se ha descrito anteriormente que puede estar presente en la muestra de ensayo. El analito puede incluir una proteína, un polipéptido o una diana de nucleótidos. El analito puede estar soluble en un fluido corporal tal como sangre, plasma sanguíneo o suero, orina o similar. El analito puede estar en un tejido, en una superficie celular o dentro de una célula. El analito puede estar  
20 sobre o en una célula dispersada en un fluido corporal tal como sangre, orina, aspirado de mama u obtenida como una muestra de biopsia.

Las expresiones “enfermedades de la mama”, “enfermedad de mama” y “afección de la mama” se usan indistintamente en este documento para referirse a cualquier enfermedad o afección de al mama incluyendo, pero sin limitación, hiperplasia atípica, fibroadenoma, enfermedad quística mamaria y cáncer.

El “cáncer de mama”, como se usa en este documento, se refiere a cualquier enfermedad maligna de la mama incluyendo, pero sin limitación, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma medular, carcinoma tubular, carcinoma mucinoso, carcinoma lobular infiltrante, comedocarcinoma infiltrante y carcinoma inflamatorio.

Una “Etiqueta de Secuencia Expresada” o “EST” se refiere a la secuencia parcial de un inserto de ADNc que se ha generando por transcripción inversa de ARNm extraído de un tejido, seguida de su inserción en un vector.

Una “imagen de transcrito” se refiere a una tabla o lista que proporciona la distribución cuantitativa de EST en una genoteca y representa los genes activos en el tejido a partir del que se genera la genoteca.

La presente invención proporciona ensayos que utilizan miembros de unión específica. Un “miembro de unión específica”, como se usa en este documento, es un miembro de un par de unión específica. Es decir, dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas, por un medio químico o físico, se une específicamente a las segunda molécula. Por lo tanto, además de pares de unión específica de antígeno y anticuerpo de inmunoensayos comunes, otros pares de unión específica pueden incluir biotina y avidina, carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores de enzimas y enzimas y similares. Además, los pares de unión específica pueden incluir miembros que sean análogos de los miembros de unión  
45 específica originales, por ejemplo, un analito-análogo. Los miembros de unión específica inmunoreactivos incluyen antígenos, fragmentos antigénicos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales y complejos de los mismos, incluyendo los formados por moléculas de ADN recombinantes.

Los miembros de unión específica incluyen “moléculas de unión específica”. Una “molécula de unión específica” se refiere a cualquier miembro de unión específica, particularmente un miembro de unión específica inmunoreactivo. Como tal, la expresión “molécula de unión específica” incluye moléculas de anticuerpo (obtenidas de preparaciones tanto policlonales como monoclonales), así como los siguientes: moléculas de anticuerpo híbridas (quiméricas) (véanse, por ejemplo, Winter, *et al.*, Nature 349: 293-299 (1991), y Patente de Estados Unidos N° 4.816.567); fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y F(ab); moléculas Fv (heterodímeros no covalentes, véase, por ejemplo, Inbar, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2659-2662 (1972), y Ehrlich, *et al.*, Biochem. 19: 4091-4096 (1980)); moléculas Fv de cadena sencilla (sFv) (véase, por ejemplo, Huston, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883(1988)); moléculas de anticuerpo humanizadas (véase, por ejemplo, Riechmann, *et al.*, Nature 332: 323-327 (1988), Verhoeyan, *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988), y Publicación de Patente del Reino Unido N° GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994); y cualquier fragmento funcional obtenido de dichas moléculas, donde dichos fragmentos conservan propiedades de  
60 unión inmunológicas de la molécula de anticuerpo precursora.

El término “hapteno” como se usa en este documento se refiere a un antígeno parcial o miembro de unión no proteico que es capaz de unirse a un anticuerpo pero que no es capaz de generar la formación de anticuerpos a menos que se acople a una proteína transportadora.

Un “reactivo de captura”, como se usa en este documento, se refiere a un miembro de unión específica no marcado que es específico para el analito como en un ensayo tipo sándwich, para el reactivo indicador o analito como en un ensayo competitivo o para un miembro de unión específica auxiliar, que por sí mismo es específico para el analito,

## ES 2 343 103 T3

como en un ensayo indirecto. El reactivo de captura puede unirse directa o indirectamente a un material de fase sólida antes de la realización del ensayo o durante la realización del ensayo, permitiendo de este modo la separación de los complejos inmovilizados de la muestra de ensayo.

5 El “reactivo indiciador” comprende un “compuesto generador de señal” (“marcador”) que es capaz de generar y genera una señal medible detectable por medios externos, conjugado (“unido”) a un miembro de unión específica. Además de ser un miembro de anticuerpo de un par de unión específica, el reactivo indicador también puede ser un miembro de cualquier par de unión específica, incluyendo cualquier sistema hapteno-antihapteno tal como biotina o antibiotina, avidina o biotina, un carbohidrato o una lectina, una secuencia de nucleótidos complementaria, una molécula efectora o receptora, un cofactor enzimático y una enzima, un inhibidor enzimático o una enzima y similares. 10 Un miembro de unión específica inmunorreactivo puede ser un anticuerpo, un antígeno o un complejo de antígeno/anticuerpo que es capaz de unirse al polipéptido de interés como en un ensayo tipo sándwich, al reactivo de captura como en un ensayo competitivo o al miembro de unión específica auxiliar como en un ensayo indirecto. Cuando se describen sondas y ensayos de sondas, puede usarse la expresión “molécula receptora”. Una molécula indicadora 15 comprende un compuesto generador de señal como se ha descrito anteriormente en este documento, conjugado con un miembro de unión específica de un par de unión específica tal como carbazol o adamantano.

Los diversos “compuestos generadores de señal” (marcadores) contemplados incluyen cromógenos, catalizadores tales como enzimas, compuestos luminiscentes tales como fluoresceína y rodamina, compuestos quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridinios, fenantridínios y luminol, elementos radioactivos y marcadores visuales directos. 20 Los ejemplos de enzimas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y similares. La selección de un marcador particular no es crítica, pero debe ser capaz de producir una señal por sí mismo o junto con una o más sustancias adicionales.

25 Las “fases sólidas” (“soportes sólidos”) son conocidas por los expertos en la materia e incluyen las paredes de pocillos de una bandeja de reacción, tubos de ensayo, perlas de poliestireno, perlas magnéticas o no magnéticas, tiras de nitrocelulosa, membranas, micropartículas tales como partículas de látex, eritrocitos de oveja (u otro animal) y Duracytes® (eritrocitos “fijados” por aldehído pirúvico y formaldehído disponibles en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y otros. La “fase sólida” no es crítica y puede seleccionarse por un experto en la materia. Por lo tanto, 30 las partículas de látex, micropartículas, perlas magnéticas o no magnéticas, membranas, tubos de plástico, paredes de pocillos de microtitulación, microplacas de vidrio o silicio, eritrocitos de oveja (o de otro animal adecuado) y Duracytes® son todos ejemplos adecuados. Los métodos adecuados para inmovilizar péptidos en fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. Una “fase sólida” como se usa en este documento se refiere a cualquier material que es insoluble o que puede hacerse insoluble por una reacción posterior. La fase sólida puede seleccionarse por su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar el reactivo de captura. Como alternativa, la fase sólida puede retener un receptor adicional que tenga la capacidad de atraer e inmovilizar el reactivo de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia cargada que esté cargada de forma opuesta con respecto al propio reactivo de captura, o a una sustancia cargada conjugada con el reactivo de captura. Como otra alternativa más, la molécula receptora puede ser cualquier miembro de unión específica que se inmovilice sobre (se una a) la fase sólida 40 y que tenga la capacidad de inmovilizar el reactivo de captura por medio de una reacción de unión específica. La molécula receptora permite la unión indirecta del reactivo de captura a un material en fase sólida antes de la realización del ensayo durante la realización del ensayo. La fase sólida por lo tanto puede ser un plástico, plástico derivatizado, metal magnético o no magnético, superficie de vidrio o silicio de un tubo de ensayo, placa de microtitulación, lámina, perla, micropartícula, microplaca, eritrocitos de oveja (u otro animal adecuado), Duracytes® y otras configuraciones 45 conocidas por los expertos en la materia.

Se contempla e incluye en el alcance de la presente invención que la fase sólida también puede comprender cualquier material poroso adecuado con una porosidad suficiente para permitir el acceso por anticuerpos de detección y una afinidad superficial adecuada para unirse a antígenos. Se prefieren generalmente estructuras microporosas, pero también pueden usarse materiales con una estructura de gel en el estado hidratado. Dichos soportes sólidos útiles incluyen, pero sin limitación, nitrocelulosa y nylon. Se contempla que dichos soportes sólidos porosos descritos en este documento estén preferiblemente en forma de láminas de un espesor de aproximadamente 0,01 a 0,5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mm. El tamaño de poro puede variar dentro de amplios límites y preferiblemente es de aproximadamente 0,025 a 15 micrómetros, especialmente de aproximadamente 0,15 a 15 micrómetros. La superficie de dichos soportes puede activarse por procesos químicos que causan un enlace covalente del antígeno o anticuerpo al soporte. La unión irreversible al antígeno o anticuerpo se obtiene, sin embargo, en general, por adsorción sobre el material poroso mediante fuerzas hidrófobas que se conocen poco. Se conocen en la técnica otros soportes sólidos adecuados.

### Reactivos

60 La presente invención proporciona reactivos tales como secuencias polinucleotídicas derivadas de un tejido de mama de interés y designadas como BS322, polipéptidos codificados por las mismas y anticuerpos específicos para estos polipéptidos. La presente invención también proporciona reactivos tales como fragmentos oligonucleotídicos derivados de los polinucleótidos descritos y secuencias de ácido nucleico complementarias a estos polinucleótidos. 65 Los polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos de la presente invención pueden usarse para proporcionar información que lleve a la detección, diagnóstico, determinación de fase, control, pronóstico, formación de imágenes *in vivo*, prevención o tratamiento de, o determinación de la predisposición a enfermedades y afecciones de la mama, tales como cáncer de mama. Las secuencias descritas en este documento representan polinucleótidos únicos que pueden

## ES 2 343 103 T3

usarse en ensayos o para producir un perfil específico de actividad de transcripción de genes. Dichos ensayos se describen en la Patente Europea Número 0373203B1 y la Publicación Internacional N° WO 95/11995.

5 Pueden usarse polinucleótidos derivados de BS322 seleccionados en los métodos descritos en este documento para la detección de expresión génica normal o alterada. Dichos métodos pueden emplear polinucleótidos u oligonucleótidos de BS322, fragmentos o derivados de los mismos o secuencias de ácido nucleico complementarias a los mismos.

10 Los polinucleótidos descritos en este documento, sus secuencias complementarias o fragmentos de cualquiera pueden usarse en ensayos para detectar, amplificar o cuantificar genes, ácidos nucleicos, ADNc o ARNm relacionados con enfermedad de tejido mamario y afecciones asociadas con los mismos. También pueden usarse para identificar una región codificante completa o parcial de un polipéptido BS322. Pueden proporcionarse además en recipientes individuales en forma de kits de ensayo o proporcionarse como composiciones individuales. Si se proporcionan en un kit de ensayo, pueden incluirse otros reactivos adecuados tales como tampones, conjugados y similares.

15 El polinucleótido puede estar en forma de ARN o ADN. Se incluyen en el alcance de la presente invención polinucleótidos en forma de ADN, ADNc, ADN genómico, análogos de ácidos nucleicos y ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario y, si es monocatenario, puede ser la cadena codificante (sentido) o cadena no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante proporcionada en este documento o puede ser una secuencia codificante diferente cuya secuencia codificante, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético codifica el mismo polipéptido que el ADN proporcionado en este documento.

20 Este polinucleótido puede incluir sólo la secuencia codificante para el polipéptido o la secuencia codificante para el polipéptido y una secuencia codificante adicional tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia de proproteína, o la secuencia codificante del polipéptido (y opcionalmente una secuencia codificante adicional) y secuencia no codificante, tal como una secuencia no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido.

30 Además, la secuencia codificante del polipéptido puede fusionarse en la misma fase de lectura con una secuencia polinucleotídica que ayude a la expresión y secreción de un polipéptido a partir de una célula huésped, por ejemplo, una secuencia líder que funcione como secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula huésped para formar el polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una preproteína que es la proteína más restos aminoacídicos 5' adicionales. Una proteína que tiene una prosequencia es una proteína y puede, en algunos casos, ser una forma inactiva de la proteína. Una vez que se escinde la prosequencia, queda una proteína activa. Por lo tanto, el polinucleótido de la presente invención puede codificar una proteína, o una proteína que tiene un prosequencia, o una proteína que tiene tanto una prosequencia (secuencia líder) como una prosequencia.

40 Los polinucleótidos de la presente invención también pueden tener la secuencia codificante fusionada en una fase de lectura con una secuencia marcadora que permita la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido fusionado con el marcador en el caso de un huésped bacteriano, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) cuando se usa un huésped de mamífero, por ejemplo, una línea celular COS-7. La etiqueta HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza. Véase, por ejemplo, I. Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984).

50 Se contempla que se considerará que los polinucleótidos hibridan con las secuencias proporcionadas en este documento si existe una identidad de al menos el 50%, preferiblemente de al menos el 70% y más preferiblemente de al menos el 90% entre el polinucleótido y la secuencia.

El grado de identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico afecta enormemente la eficacia e intensidad de acontecimientos de hibridación entre dichas moléculas. Una secuencia de ácido nucleico parcialmente idéntica es una que inhibirá al menos parcialmente la hibridación de una secuencia completamente idéntica con una molécula diana. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente idéntica puede evaluarse usando ensayos de hibridación que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, transferencia de Southern, transferencia de Northern, hibridación en solución, hibridación *in situ* o similares, véase Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Dichos ensayos pueden realizarse usando grados variables de selectividad, por ejemplo, usando condiciones variables de rigurosidad reducida a elevada. Si se emplean condiciones de baja rigurosidad, la ausencia de unión inespecífica puede evaluarse usando una sonda secundaria que incluso carece de un grado de identidad de secuencia parcial (por ejemplo, una sonda que tiene una identidad de secuencia de menos de aproximadamente el 30% con la molécula diana) de modo que en ausencia de acontecimientos de unión inespecífica, la sonda secundaria no hibridará con la diana.

65 Cuando se utiliza un sistema de detección basado en hibridación, se selecciona una sonda de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana y, después, por selección de condiciones apropiadas la sonda y la secuencia diana "hibridan selectivamente" o se unen entre sí para formar una molécula híbrida. En una realización de la presente invención, una molécula de ácido nucleico es capaz de hibridar selectivamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. En el contexto de la presente invención, las condiciones de

hibridación moderadamente rigurosas permiten la detección de una secuencia de ácido nucleico diana de al menos 14 nucleótidos de longitud que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. En otra realización, dicha hibridación selectiva se realiza en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de hibridación rigurosas permiten la detección de secuencias de ácido nucleico diana de al menos 14 nucleótidos de longitud que tienen una identidad de secuencia superior al 90% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación útiles para la hibridación de sonda/diana en las que la sonda y la diana tienen un grado específico de identidad de secuencia pueden determinarse como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, editores B. D. Hames y S. J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press). Pueden formarse moléculas híbridas, por ejemplo, en un soporte sólido, en solución o en secciones tisulares. La formación de híbridos puede controlarse por inclusión de una molécula indicadora, típicamente en la sonda. Dichas moléculas indicadoras o elementos detectables incluyen, pero sin limitación, elementos radiactivos, marcadores fluorescentes y moléculas a las que puede unirse un ligando conjugado con una enzima.

Con respecto a las condiciones de rigurosidad para la hibridación, se sabe bien en la técnica que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para establecer una rigurosidad particular variando, por ejemplo, los factores siguientes: la longitud y naturaleza de secuencias de sonda y diana, la composición de bases de las diversas secuencias, concentraciones de sales y otros componentes de solución de hibridación, la presencia o ausencia de agentes bloqueantes en las soluciones de hibridación (por ejemplo, formamida, sulfato de dextrano y polietilenglicol), la temperatura de reacción de hibridación y parámetros temporales así como condiciones de lavado variables. La selección de un conjunto de condiciones de hibridación particulares está bien dentro de las habilidades del experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, (1989) Cold Spring Harbor, N. Y.).

La presente invención también proporciona un anticuerpo producido por el uso de un polipéptido BS322 purificado del que al menos una porción del polipéptido está codificada por un polinucleótido de BS322 seleccionado de los polinucleótidos proporcionados en este documento. Estos anticuerpos pueden usarse en los métodos proporcionados en este documento para la detección de antígeno BS322 en muestras de ensayo. La presencia de antígeno BS322 en las muestras de ensayo es indicativa de la presencia de una enfermedad o afección de mama. El anticuerpo también puede usarse para fines terapéuticos, por ejemplo, en la neutralización de la actividad de polipéptido BS322 en afecciones asociadas con una expresión alterada o anormal.

La presente descripción se refiere además a un polipéptido BS322 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida como se proporciona en este documento, así como fragmentos, análogos y derivados de dicho polipéptido. El polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido purificado natural o un polipéptido sintético. El fragmento, derivado o análogo del polipéptido BS322 puede ser uno en el que uno o más de los restos aminoacídicos se sustituya con un resto aminoacídico conservado o no conservado (preferiblemente un resto aminoacídico conservado) y dicho resto aminoacídico sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético; o puede ser uno en el que uno o más de los restos aminoacídicos incluye un grupo sustituyente; o puede ser uno en el que el polipéptido se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol) o puede ser uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionen con el polipéptido, tal como una secuencia líder o secretora, una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido o una secuencia de proproteína. Dichos fragmentos, derivados y análogos están dentro del alcance de la presente invención. Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en una forma aislada y preferiblemente purificada.

Por lo tanto, un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a la del polipéptido de origen natural o que sea diferente por variaciones minoritarias debido a una o más sustituciones de aminoácidos. La variación puede ser un "cambio conservativo", típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos, en el que el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, sustitución de leucina con isoleucina o de treonina con serina. Por el contrario, las variaciones pueden incluir cambios no conservativos, por ejemplo, sustitución de una glicina con un triptófano. Las variaciones minoritarias similares también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Pueden encontrarse orientaciones para determinar cuáles y cómo pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse muchos restos aminoacídicos sin cambiar la actividad biológica o inmunológica usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el programa informático DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison WI).

Pueden usarse sondas construidas de acuerdo con las secuencias polinucleotídicas de la presente invención en diversos métodos de ensayo para proporcionar diversos tipos de análisis. Por ejemplo, dichas sondas pueden usarse en tecnología de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para realizar análisis cromosómico y usarse para identificar alteraciones estructurales específicas de cáncer en los cromosomas, tales como deleciones o translocaciones que sean visibles a partir de extensiones de cromosomas o detectables usando sondas oligonucleotídicas específicas de alelo y/o generadas por PCR, amplificación específica de alelo o por secuenciación directa. También pueden marcarse sondas con radioisótopos, haptenos directa o indirectamente detectables o moléculas fluorescentes y utilizarse para estudios de hibridación *in situ* para evaluar la expresión de ARNm del gen que comprende el polinucleótido en muestras de tejido o células.

Esta invención también proporciona contenidos en lo que se refiere a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos proporcionados en este documento.

*Ensayos de Sondas*

Las secuencias proporcionadas en este documento pueden usarse para producir sondas que pueden usarse en ensayos para la detección de ácidos nucleicos en muestras de ensayo. Las sondas pueden diseñarse a partir de regiones de nucleótidos conservadas de los polinucleótidos de interés o a partir de regiones de nucleótidos no conservadas del polinucleótido de interés. El diseño de dichas sondas para su optimización en ensayos está dentro de las habilidades del experto habitual en la materia. Generalmente, se desarrollan sondas de ácido nucleico a partir de regiones únicas o no conservadas cuando se desea una especificidad máxima, y se desarrollan sondas de ácido nucleico a partir de regiones conservadas cuando se ensayan para determinar regiones de nucleótidos que están estrechamente relacionadas con, por ejemplo, diferentes miembros de una familia de múltiples genes o en especies relacionadas como ratón y ser humano.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica para amplificar una secuencia de ácido nucleico deseada (diana) contenida en un ácido nucleico o una mezcla de los mismos. En la PCR, se emplean un par de cebadores en exceso para hibridar con las cadenas complementarias del ácido nucleico diana. Los cebadores se extienden cada uno por una polimerasa usando el ácido nucleico diana como molde. Los productos de extensión se vuelven secuencias diana por sí mismos, después de la disociación de la cadena diana original. Después, hibridan nuevos cebadores y se extienden por una polimerasa, y el ciclo se repite para aumentar geoméricamente el número de moléculas de secuencia diana. La PCR se describe en las Patentes de Estados Unidos 4.683.195 y 4.683.202.

La Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR) es un método alternativo para la amplificación de ácido nucleico. En la LCR, se usan pares de sondas que incluyen dos sondas primarias (primera y segunda) y dos secundarias (tercera y cuarta), empleándose todas en exceso molar respecto a la diana. La primera sonda hibrida con un primer segmento de la cadena diana y la segunda sonda hibrida con un segundo segmento de la cadena diana, estando el primer y segundo segmentos contiguos de modo que las sondas primarias están contiguas entre sí en una relación 5' fosfato-3' hidroxilo, y de modo que una ligasa puede fusionar o ligar covalentemente las dos sondas en un producto fusionado. Además, una tercera sonda (secundaria) puede hibridar con una porción de la primera sonda y una cuarta sonda (secundaria) puede hibridar con una porción de la segunda sonda de una forma colindante similar. Por supuesto, si la diana es inicialmente bicatenaria, las sondas secundarias también hibridarán con la complementaria de la diana en el primer caso. Una vez que la cadena ligada de sondas primarias se separa de la cadena diana, hibridará con la tercera y cuarta sondas que pueden ligarse para formar un producto ligado secundario complementario. Es importante darse cuenta de que los productos ligados son funcionalmente equivalentes a la diana o a su complementaria. Por ciclos repetidos de hibridación y ligación, se consigue la amplificación de la secuencia diana. Esta técnica se describe más completamente en el documento EP-A- 320 308 de K. Backman publicado el 16 de junio de 1989 y el documento EP-A-439 182 de K. Backman *et al.*, publicado el 31 de julio de 1991.

Para la amplificación de ARNm, se incluye en el alcance de la presente invención realizar una transcripción inversa de ARNm en ARNc, seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR); o usar una sola enzima para ambas etapas como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.322.770; o realizar una transcripción inversa de ARNm en ADNc seguida de reacción en cadena de la ligasa con huecos asimétricos (RT-AGLCR) como se describe por R. L. Marshall *et al.*, PCR Methods and Applications 4: 80-84 (1994).

Otros métodos de amplificación conocidos que pueden utilizarse en este documento incluyen, pero sin limitación, la denomina técnica "NASBA" o "3SR" descrita por J. C. Guatelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878 (1990) y también descrita por J. Compton, Nature 350 (N° 6313): 91 -92 (1991); la amplificación de Q-beta como se describe en la Solicitud de Patente Europea publicada (EPA) N° 4544610; la amplificación por desplazamiento de cadena (como se describe en G. T. Walker *et al.*, Clin. Chem. 42: 9-13 [1996]) y la Solicitud de Patente Europea N° 684315; y la amplificación mediada por diana como se describe en la Publicación Internacional N° WO 93/22461.

La detección de BS322 puede conseguirse usando cualquier método de detección adecuado incluyendo los métodos de detección que se conocen actualmente en la técnica, así como estrategias de detección que puedan desarrollarse después. Véase, por ejemplo, Caskey *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.582.989, Gelfand *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.210.015. Los ejemplos de dichos métodos de detección incluyen métodos de amplificación de diana, así como tecnologías de amplificación de señal. Un ejemplo de métodos de detección conocidos en la actualidad incluiría las tecnologías de amplificación de ácido nucleico denominadas PCR, LCR, NASBA, SDA, RCR y TMA. Véase, por ejemplo, Caskey *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.582.989, Gelfand *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.210.015. La detección también pueden conseguirse usando una amplificación de señal tal como la descrita en Snitman *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.273.882. Aunque en la actualidad se prefiere la amplificación de diana o señal, se contempla y se incluye en el alcance de la presente invención que puedan utilizarse en este documento métodos de detección ultrasensibles que no requieran amplificación.

La detección, tanto amplificada como no amplificada, puede realizarse usando una diversidad de formatos de detección heterogéneos y homogéneos. Se describen ejemplos de formatos de detección heterogéneos en Snitman *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.273.882, Albarella *et al.*, en el documento EP-84114441.9, Urdea *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.124.246, Ullman *et al.* Patente de Estados Unidos N° 5.185.243 y Kourilsky *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.581.333. Se describen ejemplos de formatos de detección homogéneos en Caskey *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.582.989, Gelfand *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.210.015. También se contemplan y se incluyen en el alcance de la presente invención el uso de múltiples sondas en el ensayo de hibridación, mejorando

dicho uso la sensibilidad y amplificación de la señal de BS322. Véase, por ejemplo, Caskey *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.582.989, Gelfand *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.210.015.

5 En una realización, la presente invención comprende generalmente las etapas de poner en contacto una muestra de ensayo sospechosa de contener una secuencia polinucleotídica diana con reactivos de reacción de amplificación que comprenden un cebador de amplificación y una sonda de detección que puede hibridar con una región interna de las secuencias del amplicón. Las sondas y cebadores empleados de acuerdo con el método proporcionado en este documento se marcan con marcadores de captura y detección, donde las sondas se marcan con un tipo de marcador y los cebadores se marcan con otro tipo de marcador. Además, los cebadores y sondas se seleccionan de modo que la se-  
10 cuencia de sonda tenga una temperatura de fusión inferior a las secuencias de cebador. Los reactivos de amplificación, reactivos de detección y la muestra de ensayo se ponen en condiciones de amplificación por las que, en presencia de secuencia diana, se producen copias de la secuencia diana (un amplicón). En el caso habitual, el amplicón es bicatenario porque se proporcionan cebadores para amplificar una secuencia diana y su cadena complementaria. Después, el amplicón bicatenario se desnaturaliza térmicamente para producir miembros de amplicón monocatenarios. Tras la  
15 formación de los miembros de amplicón monocatenarios, la mezcla se enfría para permitir la formación de complejos entre las sondas y los miembros de amplicón monocatenarios.

A medida que se enfrían las secuencias de amplicón monocatenarias y las secuencias de sonda, las secuencias de sonda se unen de forma preferente a los miembros de amplicón monocatenarios. Este descubrimiento es contraintuitivo dado que las secuencias de sonda se seleccionan generalmente para que sean más cortas que las secuencias de cebadores y, por lo tanto, tengan una temperatura de fusión inferior a los cebadores. Por consiguiente, la temperatura de fusión del amplicón producido por los cebadores también debería tener una temperatura de fusión superior a las sondas. Por lo tanto, a medida que se enfría la mezcla, se esperaría la formación de nuevo del amplicón de bicatenario. Sin embargo, como se ha indicado previamente, este no es el caso. Se encuentra que las sondas se unen preferentemente a los miembros de amplicón monocatenarios. Además, esta preferencia de unión de sonda/amplicón monocatenario  
25 existe incluso cuando las secuencias cebadoras se añaden en exceso sobre las sondas.

Después de que se formen los híbridos de sonda/miembro de amplicón monocatenario, se detectan. Son adecuados formatos de ensayo heterogéneos convencionales para detectar los híbridos usando los marcadores de detección y  
30 marcadores de captura presentes en los cebadores y sondas. Los híbridos pueden unirse a un reactivo de fase sólida en virtud del marcador de captura y detectarse en virtud del marcador de detección. En los casos en los que el marcador de detección es directamente detectable, la presencia de los híbridos en la fase sólida puede detectarse provocando que el marcador produzca una señal detectable, si es necesario, y detectando la señal. En los casos en los que el marcador no es detectable directamente, los híbridos capturados pueden ponerse en contacto con un conjugado, que generalmente comprende un miembro de unión unido a un marcador detectable directamente. El conjugado se une a  
35 los complejos y la presencia del conjugado en los complejos puede detectarse con el marcador detectable directamente. Por lo tanto, puede determinarse la presencia de los híbridos en el reactivo de fase sólida. Los expertos en la materia reconocerán que pueden emplearse etapas de lavado para eliminar por lavado el amplicón o sonda sin hibridar, así como el conjugado no unido.

40 En una realización, los ensayos heterogéneos pueden realizarse convenientemente usando un soporte de fase sólida que lleve una matriz de moléculas de ácido nucleico. Dichas matrices son útiles para formatos de ensayo múltiple y/o de alto rendimiento. Se conocen en general en la técnica diversos métodos para formar dichas matrices a partir de moléculas de ácido nucleico preformadas o métodos para generar la matriz usando técnicas de síntesis *in situ*. (Véase, por ejemplo, Dattagupta, *et al.*, Publicación EP Nº 0 234, 726A3; Southern, Patente de Estados Unidos Nº 5.700.637; Pirrung, *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.143.854; Publicación Internacional PCT Nº WO 92/10092; y Fodor, *et al.*, Science 251: 767-777 (1991)).

Aunque la secuencia diana se describe como monocatenaria, también se contempla incluir el caso en el que la  
50 secuencia diana es en realidad bicatenaria pero simplemente se separa de su complementaria antes de la hibridación con las secuencias de cebadores de amplificación. En el caso en el que se emplea PCR en este método, habitualmente se conocen los extremos de las secuencias diana. En los casos en los que se emplea LCR o una modificación de la misma en el método preferido, habitualmente se conoce la secuencia diana completa. Típicamente, la secuencia diana es una secuencia de ácido nucleico tal como, por ejemplo, ARN o ADN.

55 El método proporcionado en este documento puede usarse en reacciones de amplificación bien conocidas que incluyen mezclas de reacción de termociclado, particularmente en PCR y LCR con huecos (GLCR). Las reacciones de amplificación emplean típicamente cebadores para generar de forma repetida copias de una secuencia de ácido nucleico diana, siendo dicha secuencia diana habitualmente una región pequeña de una secuencia de ácido nucleico de mucho mayor tamaño. Los cebadores son por sí mismos secuencias de ácido nucleico que son complementarias a regiones de una secuencia diana. En condiciones de amplificación, estos cebadores hibridan o se unen a las regiones complementarias de la secuencia diana. Típicamente, se generan copias de la secuencia diana por los procesos de extensión de cebadores y/o ligación que utilizan enzimas con actividad polimerasa o ligasa, por separado o en combinación para añadir nucleótidos a los cebadores hibridados y/o ligar pares de sondas adyacentes. Los nucleótidos que se añaden  
60 a los cebadores o sondas como monómeros u oligómeros preformados también son complementarios a la secuencia diana. Una vez que los cebadores o sondas se han extendido y/o ligado lo suficiente se separan de la secuencia diana, por ejemplo, por calentamiento de la mezcla de reacción a una "temperatura de fusión", que es una a la que se disocian cadenas de ácido nucleico complementarias. Por lo tanto, se forma una secuencia complementaria a la secuencia diana.

## ES 2 343 103 T3

Después puede tener lugar un nuevo ciclo de amplificación para amplificar adicionalmente el número de secuencias diana separando cualquier secuencia bicatenaria, permitiendo que los cebadores o sondas hibriden con sus dianas respectivas, extendiendo y/o ligando los cebadores o sondas hibridados y volviendo a separarlos. Las secuencias complementarias que se generan por ciclos de amplificación pueden servir como moldes para la extensión de cebadores o rellenar el hueco de dos sondas para amplificar adicionalmente el número de secuencias diana. Típicamente, una mezcla de reacción se somete a ciclos entre 20 y 100 veces, más típicamente una mezcla de reacción se somete a ciclos entre 25 y 50 veces. Los números de ciclos pueden determinarse por el experto habitual. De esta forma, se producen múltiples copias de la secuencia diana y su secuencia complementaria. Por lo tanto, los cebadores inician la amplificación de la secuencia diana cuando está presente en condiciones de amplificación.

Generalmente, se emplean dos cebadores que son complementarios a una porción de una cadena diana y su complementaria en la PCR. Para la LCR, se emplean generalmente cuatro sondas, dos de las cuales son complementarias a una secuencia diana y dos de las cuales son complementarias de forma similar a la complementaria de la diana. Además de los conjuntos de cebadores y enzimas mencionados previamente, una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico también puede comprender otros reactivos que son bien conocidos e incluyen, pero sin limitación: cofactores enzimáticos tales como manganeso; magnesio; sales; dinucleótidos de nicotinamida adenina (NAD); y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) tales como, por ejemplo, desoxiadenina trifosfato, desoxiguanina trifosfato, desoxicitosina trifosfato y desoxitimina trifosfato.

Aunque los cebadores de amplificación inician la amplificación de la secuencia diana, la sonda de detección (o hibridación) no está implicada en la amplificación. Las sondas de detección son generalmente secuencias de ácido nucleico o análogos de ácido nucleico sin carga tales como, por ejemplo, ácidos peptidonucleicos que se describen en la Publicación Internacional N° WO 92/20702; análogos morfolino que se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.185.444, 5.034.506 y 5.142.047; y similares. Dependiendo del tipo de marcador que lleve la sonda, la sonda se emplea para capturar o detectar el amplicón generado por la reacción de amplificación. La sonda no está implicada en la amplificación de la secuencia diana y por lo tanto puede ser necesario volverla "no extensible" en el sentido de que no puedan añadirse dNTP adicionales a la sonda. Habitualmente los análogos por sí mismos no son extensibles y las sondas de ácido nucleico pueden volverse no extensibles por modificación del extremo 3' de la sonda de modo que el grupo hidroxilo ya no pueda participar en la elongación. Por ejemplo, el extremo 3' de la sonda puede funcionalizarse con el marcador de captura o de detección para ocupar de este modo o bloquear de otro modo el grupo hidroxilo. Como alternativa, el grupo 3' hidroxilo simplemente puede escindirse, sustituirse o modificarse. El documento WO 94/24311 describe modificaciones que pueden usarse para volver a la sonda no extensible.

La proporción de cebadores respecto a sondas no es importante. Por lo tanto, las sondas o los cebadores pueden añadirse a la mezcla de reacción en exceso, por lo que la concentración de unos sería superior a la concentración de los otros. Como alternativa, pueden emplearse cebadores y sondas en concentraciones equivalentes. Preferiblemente, sin embargo, los cebadores se añaden a la mezcla de reacción en exceso sobre las sondas. Por lo tanto, se prefieren proporciones de cebador respecto a sonda de, por ejemplo, 5:1 y 20:1.

Aunque la longitud de los cebadores y sondas puede variar, las secuencias de sonda se seleccionan de modo que tengan una temperatura de fusión inferior a las secuencias de cebadores. Por lo tanto, las secuencias de cebadores son generalmente más largas que las secuencias de sondas. Típicamente, las secuencias de cebadores están en el intervalo de entre 20 y 50 nucleótidos de longitud, más típicamente en el intervalo de entre 20 y 30 nucleótidos de longitud. La sonda típica está en el intervalo de entre 10 y 25 nucleótidos de longitud.

Son bien conocidos en la técnica diversos métodos para sintetizar cebadores y sondas. De forma similar, también se conocen bien en la técnica métodos para unir marcadores a cebadores o sondas. Por ejemplo, es una cuestión de rutina sintetizar los cebadores o sondas de ácido nucleico deseados usando química de fosforamidita de nucleótidos convencional e instrumentos disponibles en Applied Biosystems, Inc., (Foster City, CA), DuPont (Wilmington, DE) o Milligen (Bedford MA). Se han descrito muchos métodos para marcar oligonucleótidos tales como los cebadores o sondas de la presente invención. Tanto Enzo Biochemical (Nueva York, NY) como Clontech (Palo Alto, CA) han descrito y comercializado técnicas de marcaje de sondas. Por ejemplo, una amina primaria puede unirse a un extremo terminal de oligo 3' usando 3'-Amine-ON CPG™ (Clontech, Palo Alto, CA). De forma similar, una amina primaria puede unirse a un extremo terminal oligo 5' usando Aminomodifier II® (Clontech). Las aminas pueden reaccionar con diversos haptenos usando química de activación y enlace convencional.

Además, las publicaciones Internacionales N° WO 92/10505, publicada el 25 de junio de 1992, y WO 92/11388, publicada el 9 de julio de 1992, enseñan métodos para marcar sondas en sus extremos 5' y 3', respectivamente. De acuerdo con un método conocido para marcar un oligonucleótido, se prepara un reactivo de fosforamidita marcador y se usa para añadir el marcador al oligonucleótido durante su síntesis. Véase, por ejemplo, N. T. Thuong *et al.*, Tet. Letters 29 (46): 5905-5908 (1988); o J. S. Cohen *et al.*, Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada 07/246.688 (NTIS ORDEN N° PAT-APPL-7-246.688) (1989). Preferiblemente, las sondas se marcan en sus extremos 3' y 5'.

Un marcador de captura se une a los cebadores o sondas y puede ser un miembro de unión específica que forme un par de unión con el miembro de unión específica del reactivo de fase sólida. Se entenderá que el propio cebador o sonda puede servir como marcador de captura. Por ejemplo, en el caso en el que un miembro de unión de reactivo de fase sólida es una secuencia de ácido nucleico, puede seleccionarse de modo que se una a una porción complementaria del cebador o sonda para inmovilizar de este modo el cebador o sonda en la fase sólida. En los casos en los que la

propia sonda sirve como el miembro de unión, los especialistas en la técnica reconocerán que la sonda contendrá una secuencia o “cola” que no es complementaria a los miembros de amplicón monocatenarios. En el caso en el que el propio cebador sirve como marcador de captura, al menos una porción del cebador estará libre para hibridar con un ácido nucleico en una fase sólida ya que la sonda se selecciona para que no sea totalmente complementaria a la secuencia de cebador.

Generalmente, pueden detectarse complejos de sonda/miembro amplicón monocatenario usando técnicas empleadas comúnmente para realizar inmunoensayos heterogéneos. Preferiblemente, en esta realización, la detección se realiza de acuerdo con los protocolos usados por la instrumentación Abbott LCx<sup>®</sup> disponible en el mercado (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Los cebadores y sondas descritos en este documento son útiles en ensayos de PCR típicos, en los que la muestra de ensayo se pone en contacto con un par de cebadores, se realiza la amplificación, se añade la sonda de hibridación y se realiza la detección.

Otro método proporcionado por la presente invención comprende poner en contacto una muestra de ensayo con una pluralidad de polinucleótidos, en el que al menos un polinucleótido es una molécula BS322 como se describe en este documento, hibridar la muestra de ensayo con la pluralidad de polinucleótidos y detectar complejos de hibridación. Se identifican complejos de hibridación y se cuantifican para recopilar un perfil que sea indicativo de enfermedad de tejido mamario, tal como cáncer de mama. Las secuencias de ARN expresado pueden detectarse adicionalmente por transcripción inversa y amplificación del producto de ADN por procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo reacción en cadena a la polimerasa (PCR).

#### *Exploración de Fármacos y Terapia Génica*

Pueden usarse métodos de terapia génica para la introducción de moléculas derivadas de BS322 antisentido, tales como polinucleótidos u oligonucleótidos de la presente invención en pacientes con afecciones asociadas con una expresión anormal de polinucleótidos relacionados con una enfermedad o afección de tejido mamario, especialmente cáncer de mama. Estas moléculas, que incluyen fragmentos de ARN y ADN antisentido y ribozimas, están diseñadas para inhibir la traducción de ARNm de BS322 y pueden usarse terapéuticamente en el tratamiento de afecciones asociadas con una expresión alterada o anormal de polinucleótido de BS322.

Como alternativa, los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden administrarse a células por procedimientos conocidos en la técnica de modo que el ARN o ADN antisentido pueden expresarse *in vivo* para inhibir la producción de un polipéptido BS322 de la forma descrita anteriormente. Por lo tanto, las construcciones antisentido contra un polinucleótido de BS322 revierten la acción de transcritos de BS322 y pueden usarse para tratar afecciones patológicas de tejido mamario tales como cáncer de mama. Estas construcciones antisentido también pueden usarse para tratar metástasis tumorales.

Un método de exploración de una pluralidad de compuestos para la unión específica a un polipéptido o polipéptidos BS322, o cualquier fragmento del mismo, para identificar al menos un compuesto que se una específicamente al polipéptido BS322; comprende las etapas de proporcionar al menos un compuesto; combinar el polipéptido BS322 con cada compuesto en condiciones adecuadas durante un tiempo suficiente para permitir la unión; y detectar la unión del polipéptido BS322 a cada compuesto.

El polipéptido o fragmento peptídico empleado en dicho ensayo puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, portado en una superficie celular o localizado intracelularmente. Un método de exploración utiliza células huésped eucariotas o procariotas que se transfectan de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que pueden expresar el polipéptido o fragmento peptídico. Un fármaco, compuesto o cualquier otro agente puede explorarse contra dichas células transfectadas en ensayos de unión competitiva. Por ejemplo, la formación de complejos entre un polipéptido y el agente que se está ensayando puede medirse en células viables o fijadas.

Pueden usarse métodos de exploración para fármacos, compuestos o cualquier otro agente para tratar enfermedades asociadas con BS322. Estos métodos comprenden poner en contacto el agente con un polipéptido o fragmento del mismo y ensayar para determinar la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido o para determinar la presencia de un complejo entre el polipéptido y la célula. En ensayos de unión competitivos, el polipéptido está típicamente marcado. Después de una incubación adecuada, el polipéptido libre (sin formar complejos) o fragmento del mismo se separa del presente en forma unida y la cantidad de marcador libre o que no forma complejos se usa como medida de la capacidad del agente particular para unirse al polipéptido o para interferir con el complejo de polipéptido/célula.

La presente invención también incluye el uso de ensayos de exploración competitiva en los que anticuerpos neutralizantes capaces de unirse al polipéptido específicamente compiten con un agente de ensayo para la unión al polipéptido o fragmento del mismo. De esta forma, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier polipéptido en la muestra de ensayo que comparta uno o más determinantes antigénicos con un polipéptido BS322 como se proporciona en este documento.

Otra técnica para exploración proporciona una exploración de alto rendimiento para compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada con al menos un polipéptido de BS322 descrito en este documento. En resumen, se sintetizan grandes cantidades de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños en una fase sólida, tal como alfileres de

plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo peptídicos se hacen reaccionar con polipéptido y se lavan. Los polipéptidos unidos de este modo a la fase sólida se detectan por métodos bien conocidos en la técnica. El polipéptido purificado también puede recubrirse directamente sobre placas para su uso en las técnicas de exploración descritas en este documento. Además, pueden usarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el polipéptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido. Véase, por ejemplo, el documento EP 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984.

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos de interés biológicamente activos o de las moléculas pequeñas incluyendo agonistas, antagonistas o inhibidores con los que interaccionan. Dichos análogos estructurales pueden usarse para diseñar fármacos que sean formas estables o más activas del polipéptido o que aumenten o interfieran con la función de un polipéptido *in vivo* J. Hodgson, *Bio/Technology* 9: 19-21 (1991).

Por ejemplo, en una estrategia, la estructura tridimensional de un polipéptido o de un complejo inhibidor de polipéptido se determina por cristalografía de rayos x, por modelado por ordenador o, más típicamente, por una combinación de las dos estrategias. Tanto la forma como las cargas del polipéptido deben determinarse para elucidar la estructura y para determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Menos frecuentemente, puede obtenerse información útil respecto a la estructura de un polipéptido por modelado basado en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, se usa la información estructural pertinente para diseñar moléculas similares a polipéptidos análogos o para identificar inhibidores eficaces.

Los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos incluyen moléculas que tienen una actividad o estabilidad mejorada como se muestra por S. Braxton *et al.*, *Biochemistry* 31: 7796-7801 (1992), o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos como se muestra por S. B. P. Athauda *et al.*, *J Biochem. (Tokyo)* 113 (6): 742-746 (1993).

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana seleccionado por un ensayo como se ha descrito anteriormente en este documento y después determinar su estructura cristalina. En principio, esta estrategia produce un fármacóforo en el que puede basarse el diseño de fármaco posterior. Además, es posible evitar la cristalografía de proteínas en su conjunto generando anticuerpos antiidiotípicos ("anti-id") contra un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, el sitio de unión del anti-id es un análogo del receptor original. Después, el anti-id puede usarse para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Después, los péptidos aislados pueden actuar como el fármacóforo (es decir, un prototipo de fármaco farmacéutico).

Una cantidad suficiente de un polipéptido recombinante de la presente invención puede hacerse disponible para realizar estudios analíticos tales como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido que puede derivarse de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en este documento proporcionará una orientación a los que emplean técnicas de modelado por ordenador en lugar de, o además de, cristalografía de rayos x.

Pueden usarse además anticuerpos específicos contra un polipéptido BS322 (por ejemplo, anticuerpos anti-BS322) para inhibir la acción biológica del polipéptido por unión al polipéptido. De esta forma, los anticuerpos pueden usarse en terapia, por ejemplo, para tratar enfermedades de tejido mamario incluyendo cáncer de mama y sus metástasis.

Además, dichos anticuerpos pueden detectar la presencia o ausencia de un polipéptido BS322 en una muestra de ensayo y, por lo tanto, son útiles como marcadores de diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad o afección de tejido mamario, especialmente cáncer de mama. Dichos anticuerpos también pueden funcionar como marcador de diagnóstico para afecciones patológicas de tejido mamario tales como cáncer de mama.

Los antagonistas e inhibidores de los polipéptidos de la presente invención son los que inhiben o eliminan la función del polipéptido. Por lo tanto, por ejemplo, un antagonista puede unirse a un polipéptido de la presente invención e inhibir o eliminar su función. El antagonista, por ejemplo, podría ser un anticuerpo contra el polipéptido que elimine la actividad de un polipéptido BS322 por unión a un polipéptido BS322, o en algunos casos el antagonista puede ser un oligonucleótido. Los ejemplos de inhibidores moleculares pequeños incluyen, pero sin limitación, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos.

Los antagonistas e inhibidores pueden emplearse como una composición con un vehículo farmacéuticamente aceptable incluyendo, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La administración de inhibidores de polipéptido BS322 es preferiblemente sistémica. La presente invención también proporciona un anticuerpo que inhibe la acción de dicho polipéptido.

Puede usarse tecnología antisentido para reducir la expresión génica por formación de triple hélice o ADN o ARN antisentido, basándose ambos métodos en la unión de un polinucleótido o ADN o ARN. Por ejemplo, la porción codificante 5' de la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la presente invención se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción, evitando de este modo la transcripción y la producción del polipéptido BS322. Para la triple hélice, véase, por ejemplo, Lee *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 6: 3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science* 241: 456 (1988); y Dervan *et al.*, *Science* 251: 1360 (1991). El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de una molécula de ARNm en el polipéptido BS322.

## ES 2 343 103 T3

Para antisentido, véase, por ejemplo, Okano, J. *Neurochem.* 56: 560 (1991); y "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression," CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988). Los oligonucleótidos antisentido actúan con mayor eficacia cuando se modifican para contener enlaces internucleotídicos artificiales que vuelvan a la molécula resistente a la escisión nucleolítica. Dichos enlaces internucleotídicos artificiales incluyen, pero sin limitación, enlaces internucleotídicos metilfosfonato, fosforotiolato y fosforoamidato.

### *Tecnología Recombinante*

La presente invención proporciona células huésped y vectores de expresión que comprenden polinucleótidos de BS322 de la presente invención y métodos para la producción del polipéptido o polipéptidos que codifican. Dichos métodos comprenden cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido de BS322 y recuperar el polipéptido BS322 a partir del cultivo celular.

La presente invención también proporciona vectores que incluyen polinucleótidos de BS322 de la presente invención, células huésped que están modificadas genéticamente con vectores de la presente invención y la producción de polipéptidos de la presente invención por técnicas recombinantes.

Las células huésped están modificadas genéticamente (transfectadas, transducidas o transformadas) con los vectores de esta invención, que pueden ser vectores de clonación o vectores de expresión. El vector puede estar en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden cultivarse en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar células transfectadas o amplificar un gen o genes de BS322. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para su expresión y serán evidentes para el experto normal en la técnica.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden emplearse para producir un polipéptido por técnicas recombinantes. Por lo tanto, la secuencia polinucleotídica puede incluirse en uno cualquiera de una diversidad de vehículos de expresión, en particular, vectores o plásmidos, para expresar un polipéptido. Dichos vectores incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, por ejemplo, derivadas de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fagos; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y pseudorrabia. Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en el huésped.

La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en sitios de endonucleasa de restricción apropiados por procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos y otros se consideran dentro del alcance de los expertos en la materia. La secuencia de ADN del vector de expresión está unida operativamente a una secuencia o secuencias de control de la expresión apropiadas (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Los ejemplos representativos de dichos promotores incluyen, pero sin limitación, el LTR o el promotor de SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor P sub L de fago lambda y otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión contienen preferiblemente un gen para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transfectadas tales como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada como se ha descrito anteriormente en este documento, así como un promotor o secuencia de control apropiada, puede emplearse para transfectar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese la proteína. Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados pueden mencionarse: células bacterianas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*; *Streptomyces sp.*; células fúngicas, tales como levaduras, células de insecto tales como *Drosophila* y Sf9; células animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; células vegetales, etc. La selección de un huésped apropiado se considera que está dentro del alcance de los expertos en la materia a partir de los contenidos proporcionados en este documento.

Más particularmente, la presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias que se han descrito ampliamente anteriormente. Las construcciones comprenden un vector, tal como un plásmido o vector viral en el que se ha insertado una secuencia de la invención en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta invención, la construcción comprende además secuencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, un promotor, unido operativamente a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen grandes cantidades de vectores y promotores adecuados y están disponibles en el mercado. Se proporcionan los siguientes vectores a modo de ejemplo. Bacterianos: pINCY (Incyte Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, CA), pSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD), pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen) pBs, phagescript, psiX174, pBlue-script SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en el huésped.

El plásmido pINCY es generalmente idéntico al plásmido pSPORT1 (disponible en Life Technologies, Gaithersburg, MD) con la excepción de que tiene dos modificaciones en el polienlazador (sitio de clonación múltiple). Estas

## ES 2 343 103 T3

modificaciones son (1) carece de un sitio de restricción Hind III y (2) su sitio de restricción EcoRI se encuentra en una localización diferente. El pINCY se genera a partir del pSPORT1 por escisión del pSPORT1 tanto con Hind III como con EcoRI y sustitución del fragmento escindido del polienlazador con fragmentos de ADN sintéticos (SECUENCIA ID N° 10 y SECUENCIA ID N° 11). Esta sustitución puede realizarse de cualquier forma conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, las dos secuencias de nucleótidos, SECUENCIA ID N° 10 y SECUENCIA ID N° 11 pueden generarse sintéticamente con fosfatos terminales 5', mezclarse entre sí y después ligarse en condiciones convencionales para realizar ligaciones de extremos escalonados en el plásmido pSPORT1 cortado con Hind III y EcoRI. Después, las células huésped adecuadas (tal como células *E. coli* DH5 $\mu$ ) se transfectan con el ADN ligado y se seleccionan los clones recombinantes por su resistencia a ampicilina. Después, el ADN plasmídico se prepara a partir de clones individuales y se somete a análisis con enzimas de restricción o secuenciación de ADN para confirmar la presencia de secuencias de inserto en la orientación apropiada. También pueden emplearse otras estrategias de clonación conocidas por los expertos en la materia.

Pueden seleccionarse regiones promotoras de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores de selección. Son dos vectores apropiados pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos nombrados en particular incluyen lacI, lacZ, T3, SP6, T7, gpt, lambda P sub R, P sub L y trp. Los promotores eucariotas incluyen el temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), timidina quinasa de virus herpes simple (HSV), temprano y tardío de SV40, LTR de retrovirus y metalotioneína I de ratón. La selección del vector y promotor apropiados está bien dentro del nivel de especialidad en la técnica.

En una realización adicional, la presente invención proporciona células huésped que contienen la construcción descrita anteriormente. La célula huésped puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior tal como una célula de levadura o la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación [L. Davis *et al.*, "Basic Methods in Molecular Biology," 2ª edición, Appleton y Lang, Paramount Publishing, East Norwalk, CT (1994)].

Las construcciones en células huésped pueden usarse de una forma convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden producirse sintéticamente mediante sintetizadores peptídicos convencionales.

Las proteínas recombinantes pueden expresarse en células de mamífero, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir dichas proteínas usando ARN procedente de construcciones de ADN de la presente invención. Se describen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, (Cold Spring Harbor, NY, 1989).

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido o polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta por inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100 a 270 pb) un potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, un potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores de selección que permitan la transfección de la célula huésped, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae* y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo. Dichos promotores pueden proceder de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (OGK), factor alfa, fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase de lectura apropiada con secuencias de inicio y terminación de la traducción y, preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de proteína traducida en el espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N-terminal que confiera las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales de inicio y de terminación de la traducción adecuadas en una fase de lectura operativa con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores de selección fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y para, si es deseable, proporcionar amplificación dentro del huésped. Los huéspedes procariotas adecuados para la transfección incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aunque también pueden emplearse otros como material de elección de rutina.

Los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano comprenden un marcador de selección y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Otros vectores incluyen, pero sin limitación, PKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI). Estas secciones de "cadena principal" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural a expresar.

## ES 2 343 103 T3

Después de la transfección de un huésped adecuado y del cultivo del huésped una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se desreprime por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Típicamente las células se recogen por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos y el extracto bruto resultante se retiene para una purificación adicional.

5 Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse por cualquier método conveniente incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisis celular. Dichos métodos son bien conocidos para el experto en la materia.

También pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamífero incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono descritas por Gluzman, *Cell* 23: 175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, tales como las líneas celulares C127, HEK-293, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor adecuado y un potenciador y también cualquier sitio de unión al ribosoma necesario, sitios de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. Pueden usarse secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo, origen, promotor temprano, potenciador, sitios de corte y empalme y de poliadenilación de SV40 para proporcionar los elementos genéticos no transcritos necesarios. Los vectores útiles representativos incluyen pRc/CMV y pcDNA3 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA).

Los polipéptidos BS322 se recuperan y se purifican a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos conocidos incluyendo cromatografía de afinidad, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxiapatita o cromatografía de lectina. Se prefiere tener bajas concentraciones (aproximadamente 0,1-5 mM) de ión calcio presentes durante la purificación [Price, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 244: 917 (1969)]. Pueden usarse etapas de repliegamiento de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración del polipéptido. Por último, puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación finales.

Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención pueden ser productos purificados de forma natural expresados a partir de una línea celular de alta expresión, o un producto de procedimientos de síntesis química, o producidos por técnicas recombinantes a partir de un huésped procarionta o eucariota (por ejemplo, por células bacterianas, de levaduras, plantas superiores, insectos y mamíferos en cultivo). Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden glicosilarse con carbohidratos de mamíferos o de otros eucariotas y pueden no glicosilarse. Los polipéptidos de la invención pueden también incluir un resto aminoacídico metionina inicial.

Los plásmidos de partida pueden construirse a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos conocidos publicados. Además, se conocen en la técnica plásmidos equivalentes a los descritos y serán evidentes para un experto en la materia.

Lo siguiente es el procedimiento general para el aislamiento y análisis de clones de ADNc. En una realización particular descrita en este documento, el ARNm se aísla a partir de tejido de mama y se usa para generar la genoteca de ADNc. El tejido de mama se obtiene de pacientes por resección quirúrgica y se clasifica como tejido tumoral o no tumoral por un patólogo.

Los insertos de ADNc de aislados aleatorios de las genotecas de tejido de mama se secuencian en parte, se analizan en detalle como se expone en los Ejemplos y se describen en la Lista de Secuencias como SECUENCIA ID N° 1, SECUENCIA ID N° 2, SECUENCIA ID N° 3, SECUENCIA ID N° 4, SECUENCIA ID N° 5, SECUENCIA ID N° 6, y SECUENCIA ID N° 7. También se analiza en detalle como se expone en los Ejemplos y se describe en la Lista de Secuencias, la secuencia de longitud completa del clon 4304443H1 [denominada en este documento 4304443inh (SECUENCIA ID N° 8)]. La secuencia consenso de estos insertos se presenta como SECUENCIA ID N° 9. Estos polinucleótidos pueden contener una fase de lectura abierta completa con o sin secuencias reguladoras asociadas para un gen particular, o pueden codificar sólo una porción del gen de interés. Esto se atribuye al hecho de que muchos genes tienen una longitud de varios cientos y a veces varios miles de bases y, con la tecnología actual, no pueden clonarse en su totalidad debido a limitaciones de vector, transcripción inversa incompleta de la primera cadena o replicación incompleta de la segunda cadena. Pueden obtenerse clones secundarios contiguos que contengan secuencias de nucleótidos adicionales usando una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la materia.

Se conocen bien en la técnica métodos para secuenciar el ADN. Los métodos enzimáticos convencionales emplean ADN polimerasa, fragmento Klenow, Sequenase (US Biochemical Corp, Cleveland, OH) o Taq polimerasa para extender cadenas de ADN a partir de un cebador oligonucleotídico hibridado con el molde de ADN de interés. Se han desarrollado métodos para el uso de moldes tanto monocatenarios como bicatenarios. Los productos de reacción de terminación de cadena pueden someterse a electroforesis en geles de urea/poliacrilamida y detectarse por autorradiografía (para precursores marcados con radionucleótidos) o por fluorescencia (para precursores marcados con fluorescencia). Las recientes mejoras en la preparación de reacciones de secuenciación y análisis mecanizado usando el método de detección fluorescente han permitido la expansión del número de secuencias que pueden determinarse al día usando máquinas tales como los Secuenciadores de ADN Applied Biosystems 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## ES 2 343 103 T3

La fase de lectura de la secuencia de nucleótidos puede determinarse por varios tipos de análisis. En primer lugar, pueden analizarse las fases de lectura contenidas dentro de la secuencia codificante para determinar la presencia del codón de inicio ATG y de los codones de terminación TGA, TAA o TAG. Típicamente, una fase de lectura continuará por toda la porción principal de una secuencia de ADNc, mientras que otras fases de lectura tenderán a contener numerosos codones de terminación. En tales casos, la terminación de la fase de lectura es sencilla. En otros casos más difíciles, se requiere un análisis adicional.

Se han generado algoritmos para analizar la aparición de bases de nucleótidos individuales en cada supuesto triplete de codón. Véase, por ejemplo, J. W. Fickett, *Nuc. Acids Res.* 10:5303 (1982). El ADN codificante para organismos particulares (bacterias, plantas y animales) tiende a contener ciertos nucleótidos dentro de ciertas periodicidades de tripletes, tal como una preferencia significativa por pirimidinas en la tercera posición del codón. Estas preferencias se han incorporado en un programa informático ampliamente disponible que puede usarse para determinar el potencial codificante (y la fase) de una extensión dada de ADN. La información derivada de algoritmo combinada con la información de codones de inicio/terminación puede usarse para determinar la fase apropiada con alto grado de seguridad. Esto a su vez permite la clonación de la secuencia fácilmente en la fase de lectura correcta en vectores de expresión apropiados.

Las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento pueden unirse a una diversidad de otras secuencias polinucleotídicas y vectores de interés por medio de técnicas de ADN recombinante bien establecidas. Véase, J. Sambrook *et al.*, anteriormente. Los vectores de interés incluyen vectores de clonación tales como plásmidos, cósmidos, derivados de fagos, fagémidos, así como vectores de secuenciación, replicación y expresión y similares. En general, dichos vectores contienen un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios de digestión con endonucleasas de restricción convenientes y marcadores de selección apropiados para células huésped particulares. Los vectores pueden transferirse por una diversidad de medios conocidos por los expertos en la materia a células huésped adecuadas que después producen el ADN, ARN o polipéptidos deseados.

Ocasionalmente, los errores de secuenciación o transcripción inversa aleatoria enmascararán la presencia de la fase de lectura abierta o elemento regulador apropiado. En dichos casos, es posible determinar la fase de lectura correcta intentando expresar el polipéptido y determinando la secuencia de aminoácidos por mapeo de péptidos convencional y técnicas de secuenciación. Véase, F. M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1989). Además, la fase de lectura real de una secuencia de nucleótidos dada puede determinarse por transfección de células huésped con vectores que contienen las tres fases de lectura potenciales. Sólo las células con la secuencia de nucleótidos en la fase de lectura correcta producirán un péptido de la longitud esperada.

Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en este documento se han preparado por métodos automáticos actuales del estado de la técnica y, como tales, pueden contener nucleótidos sin identificar. Estos no supondrán un problema para los expertos en la materia que deseen realizar la invención. Pueden usarse varios métodos que emplean técnicas recombinantes convencionales descritos en J. Sambrook (anteriormente) o actualizaciones periódicas de los mismos para completar la información de secuencia ausente. Las mismas técnicas usadas para obtener una secuencia de longitud completa, como se describen en este documento, pueden usarse para obtener secuencias de nucleótidos.

La expresión de un ADNc particular puede lograrse subclonando el ADNc en un vector de expresión apropiado y transfectando este vector en un huésped de expresión apropiado. El vector de clonación usado para la generación de una genoteca de ADNc de tejido mamario puede usarse para transcribir ARNm de un ADNc particular y contiene un promotor para beta-galactosidasa, una met amino-terminal y los siete restos aminoácidos posteriores de beta-galactosidasa. Inmediatamente después de estos ocho restos hay un promotor de bacteriófago modificado por ingeniería genética útil para el cebado artificial y la transcripción, así como varios sitios de restricción únicos, incluyendo EcoRI, para su clonación. El vector puede transfectarse en una cepa huésped apropiada de *E. coli*.

La inducción de la cepa bacteriana aislada con isopropiltiogalactósido (IPTG) usando métodos convencionales producirá una proteína de fusión que contiene los primeros siete restos de la beta-galactosidasa, aproximadamente 15 restos de enlazador y el péptido codificado en el ADNc. Puesto que se generan insertos de clones de ADNc por un proceso esencialmente aleatorio, existe una posibilidad de tres de que el ADNc incluido se encuentre en la fase de lectura correcta para una traducción apropiada. Si el ADNc no está en la fase de lectura apropiada, la fase correcta puede obtenerse por delección o inserción de un número de bases apropiado por métodos bien conocidos incluyendo mutagénesis *in vitro*, digestión con exonucleasa III o nucleasa de judía mung o inclusión de un enlazador oligonucleotídico.

El ADNc puede trasladarse a otros vectores conocidos que se sabe que son útiles para la expresión de proteína en huéspedes específicos. Los cebadores oligonucleotídicos que contienen sitios de clonación y segmentos de ADN suficientes para hibridar con extensiones en ambos extremos del ADNc diana pueden sintetizarse químicamente por métodos convencionales. Después, estos cebadores pueden usarse para amplificar los segmentos génicos deseados por PCR. Los nuevos segmentos génicos resultantes pueden digerirse con enzimas de restricción apropiadas en condiciones convencionales y aislarse por electroforesis en gel. Como alternativa, pueden producirse segmentos génicos similares por digestión del ADNc con enzimas de restricción apropiadas y rellenado en los segmentos génicos ausentes con oligonucleótidos sintetizados químicamente. Los segmentos de la secuencia codificante de más de un gen pueden ligarse entre sí y clonarse en vectores apropiados para optimizar la expresión de secuencia recombinante.

Los huéspedes de expresión adecuados para dichas moléculas quiméricas incluyen, pero sin limitación, células de mamífero tales como células de Ovario de Hámster Chino (CHO) y riñón embrionario humano (HEK) 293, células de insecto, tales como células Sf9, células de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias tales como *E. coli*. Para cada uno de estos sistemas celulares, un vector de expresión útil también puede incluir un origen de replicación para permitir la propagación en bacterias y un marcador de selección tal como el gen de resistencia a antibióticos de beta-lactamasa para permitir la selección en bacterias. Además, los vectores pueden incluir un segundo marcador de selección, tal como el gen de la neomicina fosfotransferasa para permitir la selección en células huésped eucariotas transfectadas. Los vectores para su uso en huéspedes de expresión eucariotas pueden requerir la adición de una cola poli A 3' si la secuencia de interés carece de poli A.

Además, el vector puede contener promotores o potenciadores que aumenten la expresión génica. Dichos promotores son específicos de huésped e incluyen, pero sin limitación, MMTV, SV40, o promotores de metalotionina para células CHO; promotores de *trp*, *lac*, *tac* o T7 para huéspedes bacterianos; o promotores de factor alfa, alcohol oxidasa o PGH para levaduras. Pueden usarse vectores adenovirales con o sin potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus de sarcoma de Rous (RSV), para dirigir la expresión de proteína en líneas celulares de mamífero. Una vez que se obtienen cultivos homogéneos de células recombinantes, pueden recuperarse grandes cantidades de proteína producida de forma recombinante a partir del medio acondicionado y analizarse usando métodos cromatográficos bien conocidos en la técnica. Un método alternativo para la producción de grandes cantidades de proteína secretada implica la transfección de embriones de mamífero y la recuperación de la proteína recombinante de la leche producida por vacas, cabras, ovejas, etc. transgénicas. Pueden expresarse polipéptidos y moléculas estrechamente relacionadas de forma recombinante de tal forma que faciliten la purificación de proteínas. Una estrategia implica la expresión de una proteína quimérica que incluye uno o más dominios polipeptídicos adicionales no presentes de forma natural en polipéptidos humanos. Dichos dominios facilitadores de la purificación incluyen, pero sin limitación, péptidos quelantes de metales tales como dominios histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación por afinidad/extensión FLAGS (Immunex Corp, Seattle, WA). La inclusión de una secuencia enlazadora escindible tal como Factor XA o enteroquinasa de Invitrogen (San Diego, CA) entre la secuencia polipeptídica y el dominio de purificación puede ser útil para recuperar el polipéptido.

### 30 *Inmunoensayos*

Pueden utilizarse polipéptidos BS322 incluyendo fragmentos, derivados y análogos de los mismos o células que expresen dichos polipéptidos en una diversidad de ensayos, muchos de los cuales se describen en este documento, para la detección de anticuerpos contra tejido mamario. También pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, así como fragmentos Fab o el producto de una biblioteca de expresión de Fab. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de dichos anticuerpos y fragmentos.

Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos generados contra un polipéptido que comprende una secuencia de la presente invención por inyección directa del polipéptido en un animal o por administración del polipéptido a un animal tal como un ratón, conejo, cabra o ser humano. Se prefiere un ratón, conejo o cabra. El polipéptido se selecciona del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28, y fragmentos de las mismas. El anticuerpo obtenido de este modo se unirá después al propio polipéptido. De esta forma, incluso una secuencia que codifica sólo un fragmento del polipéptido puede usarse para generar anticuerpos que se unan al polipéptido nativo. Después, dichos anticuerpos pueden usarse para aislar el polipéptido de muestras de ensayo tales como tejido sospechoso de contener ese polipéptido. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Los ejemplos incluyen la técnica de hibridoma como se describe por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas como se describe por Kozbor *et al.*, *Immun. Today* 4: 72 (1983) y la técnica del hibridoma con EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos como se describe por Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc, Nueva York, NY, págs. 77-96 (1985). Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden adaptarse para adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla contra productos polipeptídicos inmunogénicos de esta invención. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778.

Diversos formatos de ensayo pueden utilizar los anticuerpos de la presente invención incluyendo inmunoensayos tipo "sándwich" y ensayos de sondas. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden emplearse en diversos sistemas de ensayo para determinar la presencia, si existe, de antígeno BS322 en una muestra de ensayo. Por ejemplo, en un primer formato de ensayo, un anticuerpo policlonal o monoclonal o fragmento del mismo, o una combinación de estos anticuerpos, que se ha recubierto sobre una fase sólida, se pone en contacto con una muestra de ensayo para formar una primera mezcla. La primera mezcla se incuba durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de antígeno/anticuerpo. Después, un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento del mismo, o una combinación de estos anticuerpos, a los que se ha unido un compuesto generador de señal, se pone en contacto con los complejos de antígeno/anticuerpo para formar una segunda mezcla. Esta segunda mezcla se incuba después durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de anticuerpo/antígeno/anticuerpo. La presencia de antígeno BS322 en la muestra de ensayo y capturado sobre la fase sólida, si existe, se determina detectando la señal medible generada por el compuesto generador de señal. La cantidad de antígeno BS322 presente en la muestra de ensayo es proporcional a la señal generada.

## ES 2 343 103 T3

En un formato de ensayo alternativo, se forma una mezcla por contacto de: (1) un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que se une específicamente al antígeno BS322, o una combinación de dichos anticuerpos unidos a un soporte sólido; (2) la muestra de ensayo, y (3) un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal o un fragmento del mismo, que se une específicamente a un antígeno BS322 diferente (o una combinación de estos anticuerpos) al que se une un compuesto generador de señal. Esta mezcla se incuba durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de anticuerpo/antígeno/anticuerpo. La presencia, si existe, de antígeno BS322 presente en la muestra de ensayo y capturado sobre la fase sólida se determina por detección de la señal medible generada por el compuesto generador de señal. La cantidad de antígeno BS322 presente en la muestra de ensayo es proporcional a la señal generada.

En otro formato de ensayo, puede emplearse uno o una combinación de al menos dos anticuerpos monoclonales de la invención como sonda competitiva para la detección de anticuerpos contra antígeno BS322. Por ejemplo, polipéptidos BS322 tales como los antígenos recombinantes descritos en este documento, en solitario o en combinación, se recubren sobre una fase sólida. Una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpo contra antígeno BS322 se incuba después con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal y al menos un anticuerpo monoclonal de la invención durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de antígeno/anticuerpo de la muestra de ensayo y reactivo indicador unido a la fase sólida o del reactivo indicador unido a la fase sólida. La reducción en la unión del anticuerpo monoclonal a la fase sólida puede medirse cuantitativamente.

En otro método de detección más, cada uno de los anticuerpos monoclonales o policlonales de la presente invención puede emplearse en la detección de antígenos BS322 en secciones tisulares, así como en células, por análisis inmunohistoquímico. Las secciones tisulares pueden cortarse de muestras de tejido fijadas químicamente o congeladas. Si los antígenos se van a detectar en células, las células pueden aislarse de sangre, orina, aspirados de mama u otros fluidos corporales. Las células pueden obtenerse por biopsia, quirúrgica o por aguja. Las células pueden aislarse por centrifugación o atracción magnética, y después marcaje con partículas magnéticas o ferrofluidos para enriquecer una fracción particular de células para su tinción con los anticuerpos de la presente invención. El análisis citoquímico en el que estos anticuerpos se marcan directamente (con, por ejemplo, fluoresceína, oro coloidal, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) o se marcan mediante el uso de anticuerpos secundarios anti-especie marcados (con diversos marcadores como se ejemplifica en este documento) para seguir la trayectoria de la histopatología de la enfermedad, también se incluye en el alcance de la presente invención.

Además, estos anticuerpos monoclonales pueden unirse a matrices similares a Sepharose activada con CNBr y usarse para la purificación por afinidad de polipéptidos BS322 específicos a partir de cultivos celulares o tejidos biológicos, tal como para purificar proteínas BS322 recombinantes y nativas.

Los anticuerpos monoclonales de la invención también pueden usarse para la generación de anticuerpos quiméricos para uso terapéutico u otras aplicaciones similares.

Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos pueden proporcionarse individualmente para detectar antígenos BS322. Las combinaciones de los anticuerpos monoclonales (y fragmentos de los mismos) proporcionados en este documento también pueden usarse juntos como componentes en una mezcla o "cóctel" de al menos un anticuerpo de BS322 de la invención, junto con anticuerpos que se unen específicamente a otras regiones de BS322, teniendo cada anticuerpo especificidades de unión diferentes. Por lo tanto, este cóctel puede incluir los anticuerpos monoclonales de la invención que se dirigen contra polipéptidos BS322 descritos en este documento y otros anticuerpos monoclonales específicos contra otros determinantes antigénicos de antígenos BS322 u otras proteínas relacionadas.

El anticuerpo policlonal o fragmento del mismo que puede usarse en los formatos de ensayo debería unirse específicamente a un polipéptido BS322 u otros polipéptidos BS322 usados adicionalmente en el ensayo. El anticuerpo policlonal usado preferiblemente es de origen de mamífero tal como un anticuerpo policlonal humano, de cabra, de conejo o de oveja que se une a un polipéptido BS322. Más preferiblemente, al anticuerpo policlonal es de origen de conejo. Los anticuerpos policlonales usados en los ensayos pueden usarse en solitario o como un cóctel de anticuerpos policlonales. Puesto que los cócteles usados en los formatos de ensayo están compuestos por anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales que tienen una especificidad de unión diferente a polipéptidos BS322, son útiles para la detección, diagnóstico, determinación de fase, control, pronóstico, formación de imágenes *in vivo*, prevención o tratamiento de, o determinación de la predisposición a enfermedades y afecciones de la mama, tales como cáncer de mama.

Se contempla y se incluye en el alcance de la presente invención que el antígeno BS322 puede ser detectable en ensayos mediante el uso de un antígeno recombinante, así como mediante el uso de un péptido sintético o péptido purificado, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos de BS322. La secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28, y fragmentos de las mismas. También se incluye en el alcance de la presente invención que pueden usarse péptidos sintéticos, recombinantes o purificados diferentes que identifican diferentes epítopos de BS322 en combinación en un ensayo para la detección, diagnóstico, determinación de fase, control, pronóstico, formación de imágenes *in vivo*, prevención o tratamiento de, o determinación de la predisposición a enfermedades y afecciones de la mama, tales como cáncer de mama. En este caso, todos estos péptidos pueden recubrirse sobre una fase sólida; o cada péptido por separado puede recubrirse sobre fases sólidas separadas, tales como micropartículas, y después combinarse para formar una mezcla de péptidos que pueden usarse posterior-

mente en ensayos. Además, se contempla que pueden usarse múltiples péptidos que definen epítomos de antígenos diferentes para la detección, diagnóstico, determinación de fase, control, pronóstico, prevención o tratamiento de, o determinación de la predisposición a enfermedades y afecciones de la mama, tales como cáncer de mama. Después, se permite que los péptidos recubiertos sobre fases sólidas o marcados con marcadores detectables compitan con los presentes en una muestra de paciente (si existen) para una cantidad de anticuerpo limitada. Una reducción en la unión de los péptidos sintéticos, recombinantes o purificados al anticuerpo (o anticuerpos) es un indicio a la presencia de antígeno BS322 en la muestra de paciente. La presencia de antígeno BS322 indica la presencia de enfermedad de tejido mamario, especialmente cáncer de mama, en el paciente. Los expertos en la materia conocen variaciones de formatos de ensayo y muchas se analizan en este documento a continuación.

En otro formato de ensayo, la presencia de anticuerpo anti-BS322 y/o antígeno BS322 puede detectarse en un ensayo simultáneo, de la forma siguiente. Una muestra de ensayo se pone en contacto simultáneamente con un reactivo de captura de un primer analito, donde dicho reactivo de captura comprende un primer miembro de unión específica para un primer analito unido a una fase sólida y un reactivo de captura para un segundo analito, donde dicho reactivo de captura comprende un primer miembro de unión para un segundo analito unido a una segunda fase sólida, para formar de este modo una mezcla. Esta mezcla se incuba durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de reactivo de captura/primer analito y reactivo de captura/segundo analito. Estos complejos así formados se ponen en contacto después con un reactivo indicador que comprende un miembro de un par de unión específica para el primer analito marcado con un compuesto generador de señal y un reactivo indicador que comprende un miembro de un par de unión específica para el segundo analito marcado con un compuesto generador de señal para formar una segunda mezcla. Esta segunda mezcla se incuba durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de reactivo de captura/primer analito/reactivo indicador y complejos de reactivo de captura/segundo analito/reactivo indicador. La presencia de uno o más analitos se determina detectando una señal generada en relación con los complejos formados en cualquiera o ambas fases sólidas como un indicio de la presencia de uno o más analitos en la muestra de ensayo. En este formato de ensayo, pueden utilizarse antígenos recombinantes obtenidos de los sistemas de expresión descritos en este documento, así como anticuerpos monoclonales producidos a partir de las proteínas obtenidas de los sistemas de expresión como se describe en este documento. Por ejemplo, en este sistema de ensayo, el antígeno BS322 puede ser el primer analito. Dichos sistemas de ensayo se describen con mayor detalle en la Publicación EP N° 0473065.

En otros formatos de ensayo más, los polipéptidos descritos en este documento pueden utilizarse para detectar la presencia de anticuerpo contra antígeno BS322 en muestras de ensayo. Por ejemplo, se incuba una muestra de ensayo con una fase sólida a la que se ha unido al menos un polipéptido tal como una proteína recombinante o péptido sintético. El polipéptido se selecciona del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28, y fragmentos de las mismas. Estas se hacen reaccionar durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de antígeno/anticuerpo. Después de la incubación, el complejo de antígeno/anticuerpo se detecta. Pueden usarse reactivos indicadores para facilitar la detección, dependiendo del sistema de ensayo elegido. En otro formato de ensayo, una muestra de ensayo se pone en contacto con una fase sólida a la que se une una proteína recombinante producida como se describe en este documento y también se pone en contacto con un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para la proteína que se ha marcado preferiblemente con un reactivo indicador. Después de la incubación durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se formen complejos de antígeno/anticuerpo, la fase sólida se separa de la fase libre y el marcador se detecta en la fase sólida o libre como un indicio de la presencia de anticuerpo contra antígeno BS322. Se contemplan otros formatos de ensayo que utilizan los antígenos recombinantes descritos en este documento. Estos incluyen poner en contacto una muestra de ensayo con una fase sólida a la que se ha unido al menos un antígeno de una primera fuente, incubar la fase sólida y la muestra de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de antígeno/anticuerpo, y después poner en contacto la fase sólida con un antígeno marcado, procediendo dicho antígeno de una segunda fuente diferente de la primera fuente. Por ejemplo, una proteína recombinante derivada de una primera fuente tal como *E. coli* se usa como antígeno de captura sobre una fase sólida, se añade una muestra de ensayo a la fase sólida así preparada y después de una incubación y de etapas de lavado convencionales según se considere o sea necesario, se utiliza una proteína recombinante obtenida de una fuente diferente (es decir, que no sea *E. coli*) como parte de un reactivo indicador que posteriormente se detecta. Asimismo, son posibles combinaciones de un antígeno recombinante en una fase sólida y un péptido sintético en la fase indicadora. Se contempla cualquier formato de ensayo que utilice un antígeno específico para BS322 producido o derivado de una primera fuente como el antígeno captura y un antígeno específico para BS322 de una segunda fuente diferente. Además, se incluyen en el alcance de esta invención diversas combinaciones de antígenos recombinantes, así como el uso de péptidos sintéticos, proteínas purificadas y similares. Ensayos como estos y otros se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.254.458, que goza de propiedad común.

Otras realizaciones que utilizan diversas otras fases sólidas también se contemplan y se incluyen en el alcance de esta invención. Por ejemplo, pueden emplearse procedimientos de captura iónicos para inmovilizar un complejo de reacción inmovilizable con un polímero cargado negativamente (descritos en la publicación EP 0326100 y la publicación EP N° 0406473), de acuerdo con la presente invención, para efectuar una reacción inmunoquímica en fase solución rápida. Un complejo inmune inmovilizable se separa del resto de la mezcla de reacción por interacciones iónicas entre el inmunocomplejo/polianión cargado negativamente y la matriz porosa cargada positivamente previamente tratada y se detecta mediante el uso de diversos sistemas generadores de señal descritos anteriormente, incluyendo los descritos en mediciones de señal quimioluminiscente, como se describe en la Publicación EPO N° 0 273.115.

Además, los métodos de la presente invención pueden adaptarse para su uso en sistemas que utilicen tecnología de micropartículas incluyendo sistemas automáticos y semiautomáticos en los que la fase sólida comprende una micropartícula (magnética o no magnética). Dichos sistemas incluyen los descritos en, por ejemplo, las solicitudes EPO publicadas N° EP 0 425 633 y EP 0 424 634, respectivamente.

5 El uso de microscopía de sonda de barrido (SPM) para inmunoensayos también es una tecnología a la que pueden adaptarse fácilmente a los anticuerpos monoclonales de la presente invención. En la microscopía de sonda de barrido, particularmente en la microscopía de fuerza atómica, la fase de captura, por ejemplo, al menos uno de los anticuerpos monoclonales de la invención, se adhiere a una fase sólida y se utiliza un microscopio de sonda de barrido para detectar complejos de antígeno/anticuerpo que pueden estar presentes en la superficie de la fase sólida. El uso de microscopía de tunelaje de barrido elimina la necesidad de marcadores que normalmente deben utilizarse en muchos sistemas de inmunoensayo para detectar complejos de antígeno/anticuerpo. El uso de SPM para controlar reacciones de unión específica puede producirse de muchas formas. En una realización, un miembro de un compañero de unión específica (sustancia específica de analito que es el anticuerpo monoclonal de la invención) se une a una superficie adecuada para el barrido. La unión de la sustancia específica de analito puede ser por adsorción a una pieza de ensayo que comprende una fase sólida de una superficie de plástico o metal, seguida de métodos conocidos por los expertos en la materia. O puede utilizarse la unión covalente de un compañero de unión específica (sustancia específica de analito) a una pieza de ensayo, comprendiendo dicha pieza de ensayo una fase sólida de plástico derivatizado, metal, silicio o vidrio. Los expertos en la materia conocen métodos de unión covalente e incluyen una diversidad de medios para unir de forma irreversible compañeros de unión específica a la pieza de ensayo. Si la pieza de ensayo es silicio o vidrio, la superficie debe activarse antes de unir el compañero de unión específica. Además, pueden usarse interacciones polielectrolíticas para inmovilizar un compañero de unión específica en una superficie de una pieza de ensayo mediante el uso de técnicas y químicas. El método preferido de unión es por medios covalentes. Después de la unión de un miembro de unión específica, la superficie puede tratarse adicionalmente con materiales tales como suero, proteínas u otros agentes de bloqueo para minimizar la unión inespecífica. La superficie también puede explorarse en el sitio de fabricación o punto de uso para verificar su idoneidad para fines de ensayo. No se espera que el proceso de barrido altere las propiedades de unión específicas de la pieza de ensayo.

Aunque la presente invención describe la preferencia por el uso de fases sólidas, se contempla que los reactivos tales como anticuerpos, proteínas y péptidos de la presente invención pueden utilizarse en sistemas de ensayo en fase no sólida. Estos sistemas de ensayo se conocen por los expertos en la materia y se considera que se incluyen en el alcance de la presente invención.

Se contempla que el reactivo empleado para el ensayo puede proporcionarse en forma de un kit de ensayo con uno o más recipientes tales como viales o frascos, conteniendo cada recipiente un reactivo separado tal como una sonda, cebador, anticuerpo monoclonal o un cóctel de anticuerpos monoclonales o un polipéptido (por ejemplo, producido sintéticamente, de forma recombinante o purificado) empleado en el ensayo. El polipéptido se selecciona del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28, y fragmentos de las mismas. Otros componentes tales como tampones, controles y similares conocidos por los expertos en la materia pueden incluirse en dichos kits de ensayo. También se contempla proporcionar kits de ensayo que tengan medios para recoger muestras de ensayo, que comprenden fluidos corporales accesibles, por ejemplo, sangre, orina, saliva y heces. Dichas herramientas útiles para la recogida (“materiales de recogida”) incluyen lancetas y papel o paño absorbente para recoger y estabilizar sangre; hisopos para recoger y estabilizar saliva; cubetas para recoger y estabilizar muestras de orina o heces. Los materiales de recogida, papeles, paños, hisopos, cubetas y similares pueden tratarse opcionalmente para evitar la desnaturalización o la adsorción irreversible de la muestra. Los materiales de recogida también pueden tratarse con o contener conservantes, estabilizantes o agentes antimicrobianos para ayudar a mantener la integridad de las muestras. También son útiles kits de ensayo diseñados para la recogida, estabilización y conservación de muestras de ensayo obtenidas por cirugía o biopsia con aguja. Se contempla que todos los kits pueden configurarse en dos componentes que pueden proporcionarse por separado; un componente para la recogida y transporte de la muestra y el otro componente para el análisis de la muestra. El componente de recogida, por ejemplo, puede proporcionarse al usuario de mercado público, mientras que los componentes para su análisis pueden proporcionarse a otros, tales como personal de laboratorio, para la determinación de la presencia, ausencia o cantidad de analito. Además, pueden configurarse kits para la recogida, estabilización y conservación de muestras de ensayo para su uso por personal no cualificado y pueden estar disponibles en el mercado público para su uso en casa con el transporte posterior a un laboratorio para el análisis de la muestra de ensayo.

#### Uso de Anticuerpos *In Vivo*

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse *in vivo*; es decir, pueden inyectarse en pacientes que se sospeche que tienen o que tienen enfermedades de la mama para usos de diagnóstico o terapéuticos. El uso de anticuerpos para el diagnóstico *in vivo* es bien conocido en la técnica. Sumerdon *et al.*, Nucl. Med. Biol 17: 247-254 (1990) han descrito un quelante de anticuerpo optimizado para la formación de imágenes radioinmunoescintográficas de tumores que expresan antígeno carcinoembrionario (CEA) usando Indio-111 como marcador. Griffin *et al.*, J Clin Onc 9: 631 -640 (1991) han descrito el uso de este agente en la detección de tumores en pacientes que se sospeche que tienen cáncer colorrectal recidivante. El uso de agentes similares con iones paramagnético como marcadores para formación de imágenes por resonancia magnética se conoce en la técnica (R. B. Lauffer, Magnetic Resonance in Medicine 22: 339-342 (1991). Se prevé que los anticuerpos dirigidos contra antígeno BS322 pueden inyectarse en pacientes que se sospeche que tienen una enfermedad de la mama tal como cáncer de mama con el fin de diagnosticar

o determinar la fase del estado patológico del paciente. El marcador usado dependerá de la modalidad de formación de imágenes seleccionada. También pueden usarse marcadores radiactivos tales como Indio-111, Tecnecio-99m, o Yodo-131 para exploraciones planares o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). También pueden usarse marcadores emisores de positrones tales como Fluoro-19 para tomografía por emisión de positrones (PET). Para MRI, pueden usarse iones paramagnéticos tales como Gadolinio (III) o Manganeso (II). La localización del marcador dentro de la mama o externo a la mama puede permitir la determinación de la propagación de la enfermedad. La cantidad de marcador dentro de la mama puede permitir la determinación de la presencia o ausencia de cáncer de mama.

Para pacientes que se sabe que tienen una enfermedad de la mama, la inyección de un anticuerpo dirigido contra antígeno BS322 puede tener un beneficio terapéutico. El anticuerpo puede ejercer su efecto sin el uso de agentes unidos por unión a antígeno BS322 expresado sobre o en el tejido u órgano. Como alternativa, el anticuerpo puede conjugarse con agentes citotóxicos tales como fármacos, toxinas o radionúclidos para potenciar su efecto terapéutico. Garnett y Baldwin, *Cancer Research* 46: 2407-2412 (1986) han descrito la preparación de un conjugado de anticuerpo monoclonal-fármaco. Pastan *et al.*, *Cell* 47: 641-648 (1986) han revisado el uso de toxinas conjugadas con anticuerpos monoclonales para la terapia de diversos cánceres. Goodwin y Meares, *Cancer Supplement* 80: 2675-2680 (1997) han descrito el uso de anticuerpos monoclonales marcados con Itrio-90 en diversas estrategias para maximizar la dosis de tumor al tiempo que se limite la toxicidad para tejidos normales. Otros radionúclidos citotóxicos conocidos incluyen Cobre-67, Yodo-131 y Rhenio-186, pudiendo todos ellos usarse para marcar anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígeno BS322 para el tratamiento del cáncer de mama.

La bacteria *E. coli* (clon 3424294H1) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (A.T.C.C.), 10801 University Blvd., Manassas, VA, el 15 de enero de 1999. El depósito se realizó bajo los términos del Tratado de Budapest y se mantendrá durante un período de treinta (30) años desde la fecha de depósito, o durante cinco (5) años después de la última solicitud del depósito o durante el periodo ejecutivo de la patente de Estados Unidos, lo que sea más largo. El depósito y cualquier otro material depositado descrito en este documento se proporciona por comodidad solamente y no es necesario para poner en práctica la presente invención en vista de los contenidos proporcionados en este documento. La secuencia de ADNc de todo el material depositado se incorpora en este documento como referencia. Al clon 3424294H1 se le concedió el N° de Depósito de la A.T.C.C. 207018.

La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplos que pretenden ilustrar pero no limitar el alcance de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Identificación de Clones Específicos de Gen BS322 en Genoteca de Tejido Mamario*

A. *Comparación de Genotecas de Etiquetas de Secuencia Expresada (EST) o Imágenes de Transcritos.* Se obtuvieron secuencias parciales de insertos de clones de ADNc denominadas "etiquetas de secuencia expresada" (EST) de genotecas de ADNc preparadas a partir de tejidos de tumor de mama, tejidos mamarios no tumorales y numerosos otros tejidos, tanto tumorales como no tumorales, y se introdujeron en una base de datos (base de datos LIFESEQ™ disponible en Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) como imágenes de transcritos de genes. Véase la Publicación Internacional N° WO 95/20681. (Una imagen de transcrito es una lista del número de EST para cada uno de los genes representados en una genoteca de tejido dada. Las EST que comparten regiones de solapamiento de secuencia mutuo se clasifican en grupos. A un grupo se le asigna un número de clon de una EST 5' representativa. A menudo, un grupo de interés puede ampliarse por comparación de su secuencia consenso con secuencias de otras EST que no cumplían los criterios para el agrupamiento automático. El alineamiento de todos los grupos disponibles y EST individuales representa un contig del que se obtiene una secuencia consenso). Las imágenes de transcritos se evaluaron después para identificar secuencias EST que fueran principalmente representativas de las genotecas de tejido de mama. Estos clones diana se clasificaron después de acuerdo con su abundancia (aparición) en las genotecas diana y su ausencia de genotecas de fondo. A los clones de mayor abundancia con baja aparición de fondo se les dio la mayor prioridad de estudio. Se descubrió EST correspondientes a la secuencia consenso de BS322 en el 16,4% (9 de 55) de genotecas de tejido de mama. Se descubrieron EST correspondientes a la secuencia consenso SECUENCIA ID N° 9 (o fragmentos de la misma) en sólo el 0,1% (1 de 940) de las otras genotecas de tejido no mamario de la base de datos. Por lo tanto, la secuencia consenso o fragmento de la misma se encontró más de 148 veces más frecuentemente en tejidos de mama que no mamarios. Los clones solapantes 4304443H1 (SECUENCIA ID N° 1), 3040232H1 (SECUENCIA ID N° 2), 3790941H1 (SECUENCIA ID N° 3), 3424294H1 (SECUENCIA ID N° 4), 2741038H1 (SECUENCIA ID N° 5), 4302934H1 (SECUENCIA ID N° 6), 158545H1 (SECUENCIA ID N° 7), respectivamente, se identificaron para un estudio adicional. Estos representaban el número mínimo de clones que (junto con la secuencia de longitud completa del clon 4304443H1 [denominada 4304443inh (SECUENCIA ID N° 8)] eran necesarios para formar el contig y de los que se obtuvo la secuencia consenso proporcionada en este documento (SECUENCIA ID N° 9).

#### B. *Generación de una Secuencia Consenso*

Las secuencias de nucleótidos de los clones 4304443H1 (SECUENCIA ID N° 1), 3040232H1 (SECUENCIA ID N° 2), 3790941H1 (SECUENCIA ID N° 3), 3424294H1 (SECUENCIA ID N° 4), 2741038H1 (SECUENCIA ID N° 5), 4302934H1 (SECUENCIA ID N° 6), 158545H1 (SECUENCIA ID N° 7) y la secuencia de longitud completa del

## ES 2 343 103 T3

clon 4304443H1 [denominada 4304443inh (SECUENCIA ID N° 8)] se introdujeron en el Programa Sequencher™ (disponible en Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) para generar un alineamiento de nucleótidos (mapa de cóntigos) y después generar su secuencia consenso (SECUENCIA ID N° 9). Las Figuras 1A-1E muestran el alineamiento de secuencia de nucleótidos de estos clones y su secuencia de nucleótidos consenso resultante (SECUENCIA ID N° 9).

5 La Figura 2 presenta el mapa de cóntigos que representa los clones 4304443H1 (SECUENCIA ID N° 1), 3040232H1 (SECUENCIA ID N° 2), 3790941H1 (SECUENCIA ID N° 3), 3424294H1 (SECUENCIA ID N° 4), 2741038H1 (SECUENCIA ID N° 5), 4302934H1 (SECUENCIA ID N° 6), 158545H1 (SECUENCIA ID N° 7), y la secuencia de longitud completa del clon 4304443H1 [denominada 4304443inh (SECUENCIA ID N° 8)] que forman regiones solapantes del gen de BS322 y la secuencia de nucleótidos consenso resultante (SECUENCIA ID N° 9) de estos clones en una presentación gráfica. Después de esto, se realizó una traducción de tres fases de lectura en la secuencia consenso (SECUENCIA ID N° 9). Se descubrió que la tercera fase directa tenía una fase de lectura abierta que codificaba una secuencia de 398 restos aminioacídicos que estaba presente como SECUENCIA ID N° 24. La fase de lectura abierta se corresponde con los nucleótidos 57-1250 de la SECUENCIA ID N° 9. Se descubrió una segunda región codificante en la segunda fase de lectura directa y solapa con la primera. Esta fase de lectura abierta (correspondiente a los nucleótidos 1171-2122 de la SECUENCIA ID N° 9) codifica una secuencia de 317 restos aminoacídicos que está presente como SECUENCIA ID N° 25. Se sabe que se producen errores raros en la traducción, denominados desplazamiento de la fase de lectura en la traducción, que permiten al ribosoma traducir dos fases de lectura parcialmente solapantes como un solo polipéptido. I. P. Ivanov *et al.* RNA 4(10): 1230-1238 (1998); y P. J. Farabaugh *Annu Rev Genet* 30: 507-528 (1996). Por lo tanto, se incluye en el alcance de esta invención que estas dos fases de lectura parcialmente solapantes puedan traducirse como un solo polipéptido.

### Ejemplo 2

#### *Secuenciación de Clones Específicos de EST de BS322*

25 La secuencia de ADN del clon 4304443H1 del cóntigo del gen de BS322 se determinó (SECUENCIA ID N° 8) usando secuenciación por terminación didesoxi con terminadores marcados con colorante siguiendo métodos conocidos [F. Sanger *et al.*, PNAS U.S.A. 74: 5463(1977)].

30 Debido a que vectores tales como pSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y pINCY (disponible en Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) contienen sitios de cebado universal justo adyacentes a las uniones de ligación 3' y 5' de los insertos, los insertos se secuenciaron en ambas direcciones usando cebadores universales, SECUENCIA ID N° 12 y SECUENCIA ID N° 13 (New England Biolabs, Beverly, MA y Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, respectivamente). Las reacciones de secuenciación se procesaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida y las secuencias se determinaron mediante un Secuenciador Applied Biosystems 377 (disponible en Applied Biosystems, Foster City, CA). Se diseñaron cebadores de secuenciación adicionales, SECUENCIAS ID N° 14-23 a partir de la información de secuencia de la secuencia consenso, SECUENCIA ID N° 9. Estos cebadores se usaron después para determinar la secuencia de ADN restante del inserto clonado de cada cadena de ADN, como se ha descrito anteriormente.

### Ejemplo 3

#### *Ácido Nucleico*

45 A. *Extracción de ARN de Tejido.* Se aísla el ARN total de tejidos de mama y de tejidos no mamarios. Se utilizan diversos métodos, incluyendo, pero sin limitación, la técnica de cloruro de litio/urea, conocida en la técnica y descrita por Kato *et al.*, (J. Virol. 61: 2182-2191, 1987), y TRIzol™ (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

50 En resumen, se pone tejido en un tubo cónico estéril en hielo y se añaden 10-15 volúmenes de LiCl 3 M, urea 6 M, EDTA 5 mM, mercaptoetanol 0,1 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). El tejido se homogeneiza con un homogeneizador Polytron® (Brinkman Instruments, Inc., Westbury, NY) durante 30-50 s en hielo. La solución se transfiere a un tubo de centrifuga de plástico de 15 ml y se pone durante una noche a -20°C. El tubo se centrifuga durante 90 min a 9.000 x g a 0-4°C y el sobrenadante se decanta inmediatamente. Se añaden diez ml de LiCl 3 M y el tubo se agita vorticialmente durante 5 s. El tubo se centrifuga durante 45 min a 11.000 x g a 0-4°C. La decantación, resuspensión en LiCl y centrifugación se repite y el sedimento final se seca al aire y se suspende en 2 ml de EDTA 1 mM, SDS al 0,5%, Tris 10 mM (pH 7,5). Se añaden veinte microlitros (20 µl) de Proteinasa K (20 mg/ml) y la solución se incubaba durante 30 min a 37°C con mezcla ocasional. Se añade un décimo de volumen (0,22-0,25 ml) de NaCl 3 M y la solución se agita vorticialmente antes de transferirla a otro tubo que contiene 2 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PCI). El tubo se agita vorticialmente durante 1-3 s y se centrifuga durante 20 min a 3.000 x g a 10°C.

60 La extracción con PCI se repite y viene seguida de dos extracciones similares con cloroformo/alcohol isoamílico (CI). La solución acuosa final se transfiere a un tubo de vidrio Corex de 15 ml previamente enfriado que contiene 6 ml de etanol absoluto, el tubo se cubre con parafilm y se pone a -20°C durante una noche. El tubo se centrifuga durante 30 min a 10.000 x g a 0-4°C y el sobrenadante de etanol se decanta inmediatamente. El sedimento de ARN se lava cuatro veces con 10 ml de etanol helado al 75% y el sedimento final se seca al aire durante 15 min a temperatura ambiente. El ARN se suspende en 0,5 ml de TE 10 mM (pH 7,6, EDTA 1 mM) y su concentración se determina espectrofotométricamente. Se alicuotean muestras de ARN y se almacenan a -70°C como precipitados de etanol.

## ES 2 343 103 T3

La calidad del ARN se determina por electroforesis en gel de agarosa (véase el Ejemplo 5, Análisis de Transferencia de Northern) y tinción con bromuro de etidio 0,5 g/ml durante una hora. Las muestras de ARN que no contienen ARNr intacto se excluyen del estudio.

5 Como alternativa, para el análisis de RT-PCR, se añade 1 ml de reactivo de ARN Ultraspec a 120 mg de tejido pulverizado en un tubo de microfuga de polipropileno de 2,0 ml homogeneizado con un homogeneizador Polytron® (Brinkman Instruments, Inc., West-bury, NY) durante 50 s y se pone en hielo durante 5 min. Después, se añaden 0,2 ml de cloroformo a cada muestra, seguido de agitación vorticial durante 15 s. La muestra se pone en hielo durante otros 5 min, seguido de centrifugación a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. La fase superior se recoge y se transfiere a otro tubo de microfuga de 2,0 ml sin ARNasa. Se añade un volumen equivalente de isopropanol a cada muestra y la solución se pone en hielo durante 10 min. La muestra se centrifuga a 12.000 x g durante 10 min a 4°C y se desecha el sobrenadante. El sedimento restante se lava dos veces con etanol frío al 75%, se resuspende por agitación vorticial y el material resuspendido se sedimenta después por centrifugación a 7.500 x g durante 5 min a 4°C. Por último, el sedimento de ARN se seca en un Speedvac (Savant, Farmingdale, NY) durante 5 min y se reconstituye en agua sin ARNasa.

B. *Extracción de ARN a partir de Células Mononucleares Sanguíneas.* Se aíslan células mononucleares a partir de muestras de sangre de pacientes por centrifugación usando Ficoll-Hypaque de la forma siguiente. Se mezcla un volumen de 10 ml de sangre completa con un volumen equivalente de Medio RPMI (Gibco-BRL, Grand Island, NY). Después, esta mezcla se refuerza con 10 ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ) y se centrifuga durante 20 30 minutos a 200 x g. La capa leucoplaquetaria que contiene las células mononucleares se retira, se diluye hasta 50 ml con PBS de Dulbecco (Gibco-BRL, Grand Island, NY) y la mezcla se centrifuga durante 10 minutos a 200 x g. Después de dos lavados, el sedimento resultante se resuspende en PBS de Dulbecco hasta un volumen final de 1 ml.

25 Se prepara el ARN a partir de las células mononucleares aisladas como se describe por N. Kato *et al.*, J. Virology 61: 2182-2191 (1987). En resumen, las células mononucleares sedimentadas se llevan a un volumen final de 1 ml y después se resuspenden en 250 µl de PBS y se mezclan con 2,5 ml de LiCl 3 M, urea 6 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). La mezcla resultante se homogeneiza y se incuba a -20°C durante una noche. El homogeneizado se centrifuga a 8.000 RPM en un rotor Beckman J2-21M durante 90 minutos a 0-4°C. El sedimento se resuspende en 10 ml de LiCl 3 M por agitación vorticial y después se centrifuga a 10.000 RPM en una centrifuga de rotor Beckman J2-21M durante 45 minutos a 0-4°C. Las etapas de resuspensión y sedimentación se repiten después. El sedimento se resuspende en 2 ml de EDTA 1 mM, SDS al 0,5%, Tris 10 mM (pH 7,5) y 400 µg de Proteínasa K con agitación vorticial y después se incuba a 37°C durante 30 minutos con agitación. Después, se añade un décimo de volumen de NaCl 3 M y la mezcla se agita vorticialmente. Las proteínas se retiran mediante dos ciclos de extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PCI), seguidos de una extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (CI). El ARN se precipita por adición de 6 ml de etanol absoluto seguida de incubación durante una noche a -20°C. Después, el ARN precipitado se recoge por centrifugación, el sedimento se lava 4 veces en etanol al 75%. El ARN sedimentado se disuelve después en una solución que contiene EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5).

40 Se usan tejidos no mamarios como controles negativos. El ARN mensajero puede purificarse adicionalmente a partir del ARN total mediante el uso de kits disponibles en el mercado tales como columnas de centrifugación de oligo dT celulosa (RediCol™ de Pharmacia, Uppsala, Suecia) para el aislamiento de ARN poliadenilado. El ARN total o ARNm puede disolverse en tampón de lisis (tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 7,0 M, pH 7,0) para su análisis en el ensayo de protección frente a ribonucleasa.

45 C. *Extracción de ARN de polisomas.* El tejido se pica en solución salina a 4°C y se mezcla con 2,5 volúmenes de sacarosa 0,8 M en una solución de TK<sub>150</sub>M (KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) que contiene 2-mercaptoetanol 6 mM. El tejido se homogeneiza en un homogeneizador Potter de Teflón-vidrio con cinco golpes a 100-200 rpm, seguidos de seis golpes en un homogeneizador Dounce, como se describe por B. Mechler, Methods in Enzymology 152: 241-248 (1987). El homogeneizado se centrifuga después a 12.000 x g durante 15 min a 4°C para sedimentar los núcleos. Los polisomas se aíslan por mezcla de 2 ml del sobrenadante con 6 ml de sacarosa 2,5 M en TK<sub>150</sub>M y poniendo en capas esta mezcla sobre 4 ml de sacarosa 2,5 M en TK<sub>150</sub>M en un tubo de polialómero de 38 ml. Se ponen en capas sucesivamente dos soluciones de TK<sub>150</sub>M en sacarosa adicionales sobre la fracción de extracto; una primera capa de 13 ml de sacarosa 2,05 M seguida de una segunda capa de 6 ml de sacarosa 1,3 M. Los polisomas se aíslan por centrifugación del gradiente a 90.000 x g durante 5 h a 4°C. Después, se toma la fracción de la interfaz de la sacarosa 1,3 M/sacarosa 2,05 M con una pipeta pasteur siliconizada y se diluye en un volumen equivalente de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM). Se añade un volumen equivalente de tampón SDS 90°C (SDS al 1%, NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) y la solución se incuba en un baño de agua en ebullición durante 2 min. A continuación, las proteínas se digieren con una digestión con Proteínasa K (50 mg/ml) durante 15 min a 37°C. El ARNm se purifica con 3 volúmenes equivalentes de extracciones de fenol-cloroformo, seguido de precipitación con 0,1 volumen de acetato sódico 2 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol al 100% a -20°C durante una noche. El ARN precipitado se recupera por centrifugación a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. El ARN se seca y se resuspende en TE (pH 7,4) o agua destilada. Después, el ARN resuspendido puede usarse en un ensayo de hibridación de transferencia puntual o transferencia por ranuras para comprobar la presencia de ARNm de BS322 (véase el Ejemplo 6).

65 La calidad del ácido nucleico y de las proteínas depende del método de preparación usado. Cada muestra puede requerir una técnica de preparación diferente para maximizar la eficacia de aislamiento de la molécula diana. Estas técnicas de preparación están dentro de las habilidades del experto en la materia.

## Ejemplo 4

*Ensayo de Protección frente a Ribonucleasa*

5 A. *Síntesis de Sonda de Hibridación de ARN Complementario (ARNc) Marcada y Cadena Sentido Sin Marcar.* Se transcriben ribosondas antisentido marcada y sentido sin marcar a partir de la secuencia de ADNc del gen de BS322 que contiene un promotor de ADN polimerasa 5' tal como SP6 o T7. La secuencia puede ser de un vector que contiene el inserto de ADNc de BS322 apropiado, o de un producto generado por PCR del inserto usando cebadores de PCR que incorporen una secuencia promotora de ARN polimerasa 5'. Por ejemplo, el plásmido descrito, los clones 4304443H1,  
10 3424294H1 u otros clones comparables, que contienen la secuencia de ADNc del gen de BS322 flanqueada por SP6 y T7 opuestos u otros promotores de ARN polimerasa, se purifica usando un Kit de Purificación de Plásmidos de Qiagen (Qiagen, Chatsworth, CA). Después se linealizan 10 µg del ADN plasmídico cortando con una enzima de restricción apropiada tal como Dde I durante 1 h a 37°C. El ADN plasmídico linealizado se purifica usando el Kit QIAprep (Qiagen, Chatsworth, CA) y se usa para la síntesis de un transcrito antisentido del promotor apropiado usando el Sistema de Transcripción *in vitro* Riboprobe® (Promega, Corporation, Madison, WI), como se describe por  
15 las instrucciones del proveedor, incorporando (alfa<sup>32</sup>P) CTP (Amersham Life Sciences, Inc. Arlington Heights, IL) o CTP biotinilado como marcador. Para generar la cadena sentido, 10 µg del ADN plasmídico purificado se cortan con enzimas de restricción tales como Xba I y Not I y se transcriben como anteriormente a partir del promotor apropiado. Ambas cadenas sentido y antisentido se aíslan por cromatografía en columna de centrifugación. La cadena sentido sin  
20 marcar se cuantifica por absorción UV a 260 nm.

B. *Hibridación de la Sonda Marcada con Diana.* El tejido congelado se pulveriza hasta polvo en nitrógeno líquido y 100-500 mg se disuelven en 1 ml de tampón de lisis disponible como componente del Kit de Protección frente a ARNasa de Lisado Direct Protect™ (Ambion, Inc., Austin, TX). Puede conseguirse una disolución adicional usando un homogeneizador tisular. Además, se realiza una serie de diluciones de una cantidad conocida de cadena sentido en lisado de hígado de ratón para su uso como control positivo. Finalmente, 45 µl de tejido solubilizado o cadena sentido  
25 diluida se mezclan directamente con; 1) 1 x 10<sup>5</sup> cpm de sonda marcada radiactivamente o 2) 250 pg de sonda marcada no isotópicamente en 5 µl de tampón de lisis. Se permite que la hibridación se desarrolle durante una noche a 37°C. Véase, T. Kaabache *et al.*, Anal. Biochem. 232: 225-230 (1995).

C. *Digestión con ARNasa.* El ARN que no se hibrida con sonda se elimina de la reacción como por el protocolo Direct Protect™ usando una solución de ARNasa A y ARNasa T1 durante 30 min a 37°C, seguido de eliminación de la ARNasa por digestión con Proteinasa K en presencia de sarcosil sódico. Los fragmentos hibridados protegidos de la digestión se precipitan después por adición de un volumen equivalente de isopropanol y se ponen a -70°C durante 3  
35 h. Los precipitados se recogen por centrifugación a 12.000 x g durante 20 min.

D. *Análisis de Fragmentos.* Los precipitados se disuelven en colorante de carga en gel desnaturante (formamida al 80%, EDTA 10 mM (pH 8,0), cianol de xileno 1 mg/ml, azul de bromofenol 1 mg/ml), se desnaturizan por calor y se someten a electroforesis en geles desnaturantes de TBE poliacrilamida al 6%, urea 8 M. Los geles se someten a formación de imágenes y se analizan usando el sistema de autorradiografía de fósforo de almacenamiento STORM™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). La cuantificación de las bandas de fragmentos protegidos, expresada en femtogramos (fg), se consigue comparando las áreas máximas obtenidas de las muestras de ensayo con las de las diluciones conocidas de la cadena sentido de control positivo (véase la Sección B, anteriormente). Los resultados se expresan en moléculas de ARN de BS322/célula y como una puntuación de clasificación de imagen. En casos en los  
40 que se usan marcadores no isotópicos, se transfieren los híbridos de los geles a membranas (nylon o nitrocelulosa) por transferencia y después se analizan usando sistemas de detección que emplean conjugados de estreptavidina-fosfatasa alcalina y reactivos de quimioluminiscencia o quimi fluorescencia.

La detección de un producto que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y fragmentos o complementarias de las mismas, es indicativa de la presencia de ARNm de BS322, sugiriendo un diagnóstico de enfermedad o afección de tejido mamario, tal como cáncer de mama.

## Ejemplo 5

55 *Transferencia de Northern*

La técnica de transferencia de Northern se usa para identificar un fragmento de ARN de un tamaño específico a partir de una población compleja de ARN usando electroforesis en gel e hibridación de ácido nucleico. La transferencia de Northern es una técnica bien conocida en el campo. En resumen, se incuban 5-10 µg de ARN total (véase el Ejemplo  
60 3) en 15 µl de una solución que contiene ácido morfolinopropanosulfónico 40 mM (MOPS) (pH 7,0), acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, formaldehído 2,2 M, formamida al 50% v/v durante 15 min a 65°C. El ARN desnaturizado se mezcla con 2 µl de tampón de carga (glicerol al 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol al 0,4%, cianol de xileno al 0,4%) y se carga en un gel de agarosa desnaturante al 1,0% que contiene MOPS 40 mM (pH 7,0), acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM y formaldehído 2,2 M. El gel se somete a electroforesis a 60 V durante 1,5 h y se aclara en agua sin ARNasa. La ARN se transfiere desde el gel sobre membranas de nylon (Brightstar-Plus, Ambion, Inc., Austin, TX) durante 1,5 horas usando el método de transferencia capilar alcalina descendente (Chomczynski, Anal. Biochem. 201: 134-139, 1992). El filtro se aclara con SSC1X y el ARN se entrecruza con el filtro usando un Stratalinker™ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) en el modo de autoentrecruzamiento y se seca durante 15 min. La membrana se coloca  
65

## ES 2 343 103 T3

después en un tubo de hibridación que contiene 20 ml de solución de prehibridación precalentada (SSC 5X, formamida al 50%, solución de Denhardt 5X, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incuba en una estufa de hibridación a 42°C durante al menos 3 h. Aunque la transferencia es de prehibridación, se genera una sonda cebada aleatoria marcada con  $^{32}\text{P}$  usando el fragmento de inserto de BS322 (obtenido por digestión de los clones 4304443H1, 3424294H1 u otros clones comparables con XbaI y NotI) usando un Sistema de Marcaje de ADN de Cebador Aleatorio (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mitad de la sonda se lleva a ebullición durante 10 min, se enfría rápidamente en hielo y se añade al tubo de hibridación. La hibridación se realiza a 42°C durante al menos 12 h. La solución de hibridación se desecha y el filtro se lava en 30 ml de SSC 3X, SDS al 0,1% a 42°C durante 15 min, seguido de 30 ml de SSC 3X, SDS al 0,1% a 42°C durante 15 min. El filtro se envuelve en Saran Wrap, se expone a una película Kodak XAR-Omat durante 8-96 h y la película se revela para su análisis. El alto nivel de expresión de ARNm correspondiente a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y fragmentos o complementarias de las mismas es un indicio de la presencia de ARNm de BS322, sugiriendo un diagnóstico de una enfermedad o afección de tejido mamario, tal como cáncer de mama.

### 15 Ejemplo 6

#### *Transferencia Puntual/Transferencia por Ranuras*

Los ensayos de transferencia puntual y por ranuras son métodos rápidos para evaluar la presencia de una secuencia de ácido nucleico específica en una mezcla compleja de ácido nucleico. Para realizar dichos ensayos, se mezclan hasta 20 de 50  $\mu\text{g}$  de ARN en 50  $\mu\text{l}$  de formamida al 50%, formaldehído al 7%, SSC 1X, se incuban 15 min a 68°C y después se enfrían en hielo. Después, se añaden 100  $\mu\text{l}$  de SSC 20X a la mezcla de ARN y se cargan al vacío en un aparato con colector de escape que tiene una membrana de nitrocelulosa o nylon preparada. La membrana se empapa en agua, SSC 20X durante 1 hora, se pone sobre dos láminas de papel de filtro Whatman n° 3 prehumedecido en SSC 20X y se carga 25 en un aparato con colector de escape al vacío de transferencia por ranuras o transferencia puntual. La transferencia por ranuras se analiza con sondas preparadas y marcadas como se ha descrito en el Ejemplo 4 anterior. La detección de ARNm correspondiente a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y fragmentos o complementarias de las mismas es un indicio de la presencia de BS322, sugiriendo un diagnóstico de una enfermedad o afección de tejido mamario, tal como cáncer de mama.

Se conocen en la técnica otros métodos y tampones que pueden utilizarse en los métodos descritos en los Ejemplos 5 y 6, pero no específicamente detallados en este documento, y se describen en J. Sambrook *et al.*, anteriormente.

### 35 Ejemplo 7

#### *Hibridación In Situ*

Este método es útil para detectar directamente secuencias de ácido nucleico diana específicas en células usando sondas de hibridación de ácido nucleico detectables.

Se preparan tejidos con agentes fijadores entrecruzantes tales como paraformaldehído o glutaraldehído para una retención de ARN celular máxima. Véase, L. Angerer *et al.*, *Methods in Cell Biol.* 35: 37-71 (1991). En resumen, el tejido se pone en más de 5 volúmenes de glutaraldehído al % en fosfato sódico 50 mM, pH 7,5 a 4°C durante 30 min. La solución se cambia con solución de glutaraldehído recién preparada (glutaraldehído al 1% en fosfato sódico 45 50 mM, pH 7,5) durante una fijación de 30 min adicional. La solución de fijación debería tener una osmolaridad de aproximadamente NaCl al 0,375%. El tejido se lava una vez en NaCl isotónico para eliminar el fosfato.

Los tejidos fijados se embeben después en parafina de la forma siguiente. El tejido se deshidrata por medio de una serie de concentraciones crecientes de etanol durante 15 min cada una: 50% (dos veces), 70% (dos veces), 85%, 90% 50 y después 100% (dos veces). A continuación, el tejido se deja en remojo en dos cambios de xileno durante 20 min cada uno a temperatura ambiente. Después, el tejido se deja en remojo en dos cambios de una mezcla 1:1 de xileno y parafina durante 20 min cada uno a 60°C; y después, en tres cambios finales de parafina durante 15 min cada uno.

A continuación, el tejido se corta en secciones de 5  $\mu\text{m}$  usando un microtomo convencional y se ponen en un portaobjetos previamente tratado con un adhesivo tisular tal como 3-aminopropiltriethoxisilano.

Se retira la parafina del tejido mediante dos remojos en xileno de 10 min y se rehidrata en una serie de concentraciones decrecientes de etanol: 99% dos veces, 95%, 85%, 70%, 50%, 30% y después en agua destilada dos veces. Las secciones se tratan previamente con HCl 0,2 M durante 10 min y se permeabilizan con Proteinasa K 2  $\mu\text{g/ml}$  a 37°C 60 durante 15 min.

Las ribosondas marcadas transcritas a partir del plásmido de gen BS322 (véase el Ejemplo 4) se hibridan con las secciones tisulares preparadas y se incuban durante una noche a 56°C y extracto de solución salina convencional 3X y formamida al 50%. El exceso de sonda se retira por lavado en solución salina con citrato convencional 2X y formamida 65 al 50%, seguido de digestión con ARNasa A 100  $\mu\text{g/ml}$  a 37°C durante 30 min. Se visualiza la sonda fluorescente por iluminación con luz ultravioleta (UV) bajo un microscopio. La fluorescencia en el citoplasma es indicativa de ARNm de BS322. Como alternativa, las secciones pueden visualizarse por autorradiografía.

## Ejemplo 8

*PCR con Transcripción Inversa*

5 A. *Ensayo de RT-PCR de una Etapa.* Se diseñan cebadores específicos de diana para detectar las secuencias diana descritas anteriormente por PCR con transcripción inversa usando métodos conocidos en la técnica. Una RT-PCR de una etapa es un procedimiento secuencial que realiza tanto una RT como una PCR en una sola mezcla de reacción. El procedimiento se realiza en una mezcla de reacción de 200  $\mu$ l que contiene (*N,N*,-bis[2-hidroxi-etil]glicina) 50 mM, pH 8,15, KOAc 81,7 mM, KOH 33,33 mM, albúmina de suero bovino 0,01 mg/ml, ácido etilendiaminotetraacético  
10 0,1 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 mg/ml, glicerol al 8% p/v, 150  $\mu$ M de cada dNTP, 0,25  $\mu$ M de cada cebador, rTth polimerasa 5U, Mn(OAc)<sub>2</sub> 3,25 mM y 5  $\mu$ l de ARN diana (véase el Ejemplo 3). Puesto que el ARN y la enzima rTth polimerasa son inestables en presencia de Mn(OAc)<sub>2</sub>, el Mn(OAc)<sub>2</sub> debería añadirse justo antes de la adición de la diana. Pueden determinarse fácilmente las condiciones óptimas para la síntesis de ADNc y el termociclado por los expertos en la materia. La reacción se incuba en un termociclador Perkin-Elmer 480. Las condiciones que pueden encontrarse útiles  
15 incluyen síntesis de ADNc a 60°-70°C durante 15-45 min y 30-45 ciclos de amplificación a 94°C, 1 min; 55°-70°C, 1 min; 72°C, 2 min. También puede realizarse una RT-PCR de una etapa mediante el uso de un procedimiento de enzima doble con Taq polimerasa y una enzima transcriptasa inversa, tal como enzimas RT (transcriptasas inversas) de MMLV (virus de la leucemia murina de Moloney) o AMV (virus de la mieloblastosis aviar).

20 B. *RT-PCR Tradicional.* Como alternativa, puede realizarse una reacción de RT-PCR de dos etapas tradicional como se describe por K. Q. Hu *et al.*, *Virology* 181: 721-726 (1991) de la forma siguiente. El ARN extraído se transcribe en una mezcla de reacción de 25  $\mu$ l que contiene Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, dNTP 500  $\mu$ M, RNasina 20 U, cebador antisentido 1  $\mu$ M y transcriptasa inversa de AMV o MMLV 25 U. La transcripción inversa se realiza a 37-45°C durante 30-60 min, seguida de una incubación adicional a 95°C durante 5 min para inactivar la  
25 RT. La PCR se realiza usando 10  $\mu$ l de la reacción de ADNc en un volumen de reacción de PCR final de 50  $\mu$ l que contiene Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 200  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M de cada cebador y 2,5 U de Taq polimerasa. Las condiciones óptimas para la síntesis de ADNc y el termociclado pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia. La reacción se incuba en un termociclador Perkin-Elmer 480 u otro instrumento comparable. Las condiciones que pueden encontrarse útiles incluyen 30-45 ciclos de amplificación (94°C, 1 min; 55-70°C, 1 min;  
30 72°C, 2 min), extensión final (72°C, 10 min) y dejar en remojo a 4°C.

C. *Análisis de Fragmentos de PCR.* Después, los productos correctos pueden verificarse por determinación de tamaño usando electroforesis en gel con tinción de gel de ácido nucleico SYBR® Green I (Molecular Probes, Eugene, OR) y formación de imágenes usando un sistema de formación de imágenes STORM, o también verificarse por análisis de  
35 transferencia de Southern, puntual o por ranuras usando una sonda marcada contra las secuencias internas del producto de PCR. Las sondas también pueden ser análogos polinucleotídicos tales como morfolinos o análogos de ácidos peptidonucleicos (PNA). La detección de un producto que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y fragmentos o complementarias de las mismas es indicativa de la presencia de ARNm de BS322, sugiriendo un diagnóstico de una enfermedad o afección de tejido mamario, tal como cáncer de mama.

## Ejemplo 9

*OH-PCR*

45 A. *Selección de sonda y marcaje.* Se diseñan cebadores y sondas específicas de diana para detectar las secuencias diana descritas anteriormente mediante PCR con hibridación de oligonucleótidos. Las Publicaciones Internacionales N° WO 92/10505, publicada el 25 de junio de 1992, y WO 92/11388, publicada el 9 de julio de 1992, muestran métodos para marcar oligonucleótidos en sus extremos 5' y 3', respectivamente. De acuerdo con un método conocido para marcar un oligonucleótido, se prepara un reactivo de fosoramidita marcador y se usa para añadir el marcador al  
50 oligonucleótido durante su síntesis. Por ejemplo, véase N. T. Thuong *et al.*, *Tet. Letters* 29(46): 5905-5908 (1988); o J. S. Cohen *et al.*, *Solicitud de Patente de Estados Unidos* publicada 07/246,688 (NTIS ORDEN N° PAT-APPL-7-246,688) (1989). Preferiblemente, las sondas se marcan en su extremo 3' para evitar su participación en la PCR y la formación de productos de extensión no deseados. Para la OH-PCR de una etapa, la sonda debería tener una T<sub>M</sub> de al menos 15°C por debajo de la T<sub>M</sub> de los cebadores. Los cebadores y sondas se utilizan como miembros de unión  
55 específica con o sin marcadores detectables, usando química de fosoramidita convencional y/o métodos de marcaje post-sintéticos que son bien conocidos por los expertos en la materia.

B. *PCR con hibridación de oligos de una etapa.* Se realiza OH-PCR en una reacción de 200  $\mu$ l que contiene (*N,N*,-bis[2-hidroxi-etil]glicina) 50 mM, pH 8,15, KOAc 81,7 mM, KOH 33,33 mM, albúmina de suero bovino 0,01 mg/ml,  
60 ácido etilendiaminotetraacético 0,1 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 mg/ml, glicerol al 8% p/v, 150  $\mu$ M de cada dNTP, 0,25  $\mu$ M de cada cebador, 3,75 nM de sonda, 5U de rTth polimerasa, 3,25 mM de Mn(OAc)<sub>2</sub> y 5  $\mu$ l de equivalentes sanguíneos de diana (véase el Ejemplo 3). Puesto que el ARN y la enzima rTth polimerasa son inestables en presencia de Mn(OAc)<sub>2</sub>, el Mn(OAc)<sub>2</sub> debería añadirse justo antes de la adición de diana. La reacción se incuba en un termociclador Perkin-Elmer 480. Las condiciones óptimas para la síntesis de ADNc y el termociclado pueden determinarse fácilmente por los  
65 expertos en la materia. Las condiciones que pueden encontrarse útiles incluyen síntesis de ADNc (60°C, 30 min), 30-45 ciclos de amplificación (94°C, 40 s; 55-70°C, 60 s), hibridación de oligo (97°C, 5 min; 15°C, 5 min; 15°C remojo). El producto de reacción correcto contiene al menos una de las cadenas del producto de PCR y una sonda hibridada internamente.

## ES 2 343 103 T3

C. *Análisis de Producto de OH-PCR*. Se detectan productos de reacción amplificados en un sistema de análisis LCx® (disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En resumen, el producto de reacción correcto se captura mediante una micropartícula marcada con anticuerpo en un sitio capturable en la cadena de producto de PCR o la sonda de hibridación, y el complejo se detecta por unión de un conjugado de anticuerpo detectable a un sitio detectable en la sonda o la cadena de PCR. Sólo es detectable un complejo que contiene una cadena de PCR hibridada con la sonda interna. Después, la detección de este complejo es indicativa de la presencia de ARNm de BS322, sugiriendo un diagnóstico de una enfermedad o afección de la mama, tal como cáncer de mama.

Existen muchos otros formatos de detección que pueden usarse y/o modificarse por los expertos en la materia para detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico derivadas de BS322 amplificadas o no amplificadas incluyendo, pero sin limitación, reacción en cadena de la ligasa (LCR, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL); Q-beta replicasa (Gene-Trak™, Naperville, Illinois), reacción en cadena ramificada (Chiron, Emeryville, CA) y ensayos de desplazamiento de cadena (Becton Dickinson, Research Triangle Park, NC).

### Ejemplo 10

#### *Producción de Péptido Sintético*

Se modelaron péptidos sintéticos, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28 y se prepararon basándose en la secuencia de aminoácidos esperada de la secuencia consenso del polipéptido BS322 (véase el Ejemplo 1). En particular, se prepararon varios péptidos BS322 derivados de la SECUENCIA ID N° 24 y la SECUENCIA ID N° 25, incluyendo los péptidos de la SECUENCIA ID N° 26 y la SECUENCIA ID N° 28. Todos los péptidos se sintetizaron en un Sintetizador de Péptidos Symphony (disponible en Rainin Instrument Co, Emeryville, CA) o instrumento similar, usando química FMOC, ciclos convencionales y activación con HBTU *in situ*. Las condiciones de escisión y desprotección eran las siguientes: un volumen de 2,5 ml de reactivo de escisión (ácido trifluoroacético al 77,5% v/v, etanoditiol al 15% v/v, agua al 2,5% v/v, tioanisol al 5% v/v, fenol al 1-2% p/v) se añadió a la resina y se agitó a temperatura ambiente durante 2-4 horas. Después, se retiró el filtrado y el péptido se precipitó a partir del reactivo de escisión con éter dietílico frío. Cada péptido se filtró, se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa usando un gradiente de agua/acetonitrilo/TFA al 0,1% y se liofilizó. El producto se confirmó por espectrometría de masas (véase el Ejemplo 12).

Se logró la formación de enlace disulfuro usando condiciones de autooxidación de la forma siguiente: el péptido se disuelve en una cantidad mínima de DMSO (aproximadamente 10 ml) antes de añadir tampón (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,2) a una concentración de 0,3-0,8 mg/ml. La reacción se controla por HPLC hasta la formación completa del enlace disulfuro, seguida de HPLC preparativa de fase inversa usando un gradiente de agua/acetonitrilo/ TFA al 0,1% y liofilización. Después, el producto se confirma mediante espectrometría de masas (véase el Ejemplo 12).

Los péptidos purificados pueden conjugarse con hemocianina de lapa californiana u otra molécula inmunorreactiva con glutaraldehído, mezclarse con adyuvante e inyectarse en animales (véase el Ejemplo 14).

### Ejemplo 11a

#### *Expresión de Proteína en una Línea Celular Usando Plásmido 577*

A. *Construcción de un Plásmido de Expresión de BS322*. El plásmido 577, descrito en el documento WO 96/41179 se ha construido para la expresión de antígenos secretados en una línea celular permanente. Este plásmido contiene los segmentos de ADN siguientes: (a) un fragmento de 23 kb de pBR322 que contiene beta-lactamasa bacteriana y origen de replicación de ADN; (b) un casete de 1,8 kb que dirige la expresión de un gen de resistencia a neomicina bajo el control de un promotor de timidina quinasa de HSV-1 y señales de adición de poli-A; (c) un casete de 1,9 kb que dirige la expresión de un gen de dihidrofolato reductasa bajo el control de un promotor de Virus de los Simios 40 (SV40) y señales de adición de poli-A; (d) un casete de 3,5 kb que dirige la expresión de una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina de conejo fusionada a una proteína E2 hepatitis de virus de la hepatitis C (HCV) modificada bajo el control del promotor y potenciador de la transcripción T-Ag del Virus de los Simios 40, el potenciador del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) seguido de un fragmento de genoma de Virus Herpes Simple-1 (HSV-1), que proporciona señales de adición poli-A; y (e) un fragmento de 0,7 kb residual de la región tardía del genoma de SV40 sin función en este plásmido. Todos los segmentos del vector se ensamblaron por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica de biología molecular.

Los plásmidos para la expresión de proteínas BS322 secretables se construyen por sustitución de la secuencia codificante de la proteína E2 del virus de la hepatitis C en el plásmido 577 con la de una secuencia polinucleotídica de BS322 seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9, y fragmentos o complementarias de las mismas, de la forma siguiente. La digestión del plásmido 577 con XbaI libera el fragmento génico E2 del virus de la hepatitis C. La cadena principal de plásmido resultante permite la inserción del inserto de ADNc de BS322 cadena debajo de la secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina de conejo que dirige las proteínas expresadas hacia la ruta secretora de la célula. El fragmento de ADNc de BS322 se genera por PCR usando procedimientos convencionales. En la secuencia de cebador de PCR sentido está codificado un sitio XbaI, inmediatamente seguido de una secuencia de 12 nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos Ser-Asn-Glu-Leu ("SNEL") para promotor el procesamiento de proteasa señal, una secreción eficaz y la estabilidad del producto final en fluidos de cultivo.

Inmediatamente después de esta secuencia de 12 nucleótidos el cebador contiene nucleótidos complementarios a secuencias de molde que codifican aminoácidos del gen de BS322. El cebador antisentido incorpora una secuencia que codifica los ocho aminoácidos siguientes justo antes de los codones de terminación: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SECUENCIA ID 29). Dentro de esta secuencia se incorpora un sitio de reconocimiento para ayudar al análisis y la purificación del producto proteico BS322. Puede utilizarse un sitio de reconocimiento (denominado "FLAG") que se reconoce por un anticuerpo monoclonal disponible en el mercado denominado anti-FLAG M2 (Eastman Kodak, Co., New Haven, CT), así como otras secuencias comparables y sus anticuerpos correspondientes. Por ejemplo, se realiza PCR usando reactivos GeneAmp® de Perkin-Elmer-Cetus, como indican las instrucciones del proveedor. Se usan cebadores de PCR a una concentración final de 0,5  $\mu$ M. Se realiza PCR sobre el molde de plásmido de BS322 en una reacción de 100  $\mu$ l durante 35 ciclos (94°C, 30 segundos; 55°C, 30 segundos; 72°C, 90 segundos) seguidos de un ciclo de extensión de 72°C durante 10 min.

**B. Transfección de Células de Ovario de Hamster Chino Deficientes en Dihidrofolato Reductasa.** El plásmido descrito anteriormente se transfecta en células CHO/dhfr- [DXB-111, Uriacio *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4451-4466 (1980)]. Estas células están disponibles en la A.T.C.C, 10801 University Blvd., Manassas, VA, con el N° de Acceso CRL 9096. La transfección se realiza usando el procedimiento mediado por liposomas catiónicos descrito por P. L. Feigner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417 (1987). Particularmente, se cultivan células CHO/dhfr- en medio F-12 de Ham complementado con suero fetal de ternera al 10%, L-glutamina (1 mM) y se siembran recién preparadas en un matraz a una densidad 5-8 x 10<sup>5</sup> células por matraz. Las células se cultivan hasta una confluencia entre el 60 y 80% para su transfección. Se añaden veinte microgramos de ADN plasmídico (20  $\mu$ g) a 1,5 ml de medio Opti-MEM I y se añaden 100  $\mu$ l de Reactivo de Lipofectina (Gibco-BRL; Grand Island, NY) a una segunda parte de 1,5 ml de medio Opti-MEM I. Las dos soluciones se mezclan y se incuban a temperatura ambiente durante 20 min. Después, el medio de cultivo se retira de las células, las células se aclaran 3 veces con 5 ml de medio Opti-MEM I. La solución de ADN plasmídico-Lipofectina-Opti-MEM I se pone sobre las células después. Las células se incuban durante 3 h a 37°C, tiempo después del cual la solución de ADN-Lipofectina-Opti-MEM I se sustituye con medio de cultivo durante 24 h adicionales antes de la selección.

**C. Selección y Amplificación.** Un día después de la transfección, las células se pasan 1:3 y se incuban con medio de selección dhfr/G418 (en lo sucesivo, "medio F-12 menos G"). El medio de selección es F-12 de Ham con L-glutamina sin hipoxantina, timidina y glicina (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas) y 300  $\mu$ g por ml de G418 (Gibco-BRL; Grand Island, NY). Se mantienen las proporciones de volumen de medio respecto a área de superficie de 5 ml por 25 cm<sup>2</sup>. Después de aproximadamente dos semanas, las células DHFR/G418 se expanden para permitir el pase y el mantenimiento continuo en medio F-12 menos G. La amplificación de cada una de las secuencias de ADNc de BS322 transfectadas se consigue por selección por etapas de células DHFR<sup>+</sup>, G418<sup>+</sup> con metotrexato (revisado por R. Schimke, Cell 37: 705-713 [1984]). Las células se incuban con medio F-12 menos G que contiene metotrexato (MTX) 150 nM (Sigma, St. Louis, MO) durante aproximadamente dos semanas hasta que aparecen colonias resistentes. Se consigue una amplificación génica adicional por selección de células adaptadas 150 nM con MTX 5  $\mu$ M.

**D. Producción de Antígenos.** Medio F-12 menos G complementado con MTX 5  $\mu$ M se echa sobre monocapas justo confluentes durante 12 a 24 h a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo se retira y las células se aclaran 3 veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) (con calcio y magnesio) (Gibco-BRL; Grand Island, NY) para eliminar el medio/suero restante que pueda estar presente. Después, las células se incuban con medio de encargo VAS (formulación de encargo de VAS con L-glutamina con HEPES sin rojo fenol, disponible en JRH Bioscience; Lenexa, KS, número de producto 52-08678P), durante 1 h a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Después, las células se cubren con VAS para producción a 5 ml por matraz T. El medio se retira después de siete días de incubación, se conserva y después se congela para esperar la purificación con las recolecciones 2, 3 y 4. Las monocapas se cubren con VAS durante 3 recolecciones más de siete días.

**E. Análisis de Expresión de Antígeno de Gen de BS322 en Tejido de Mama.** Se analizaron alícuotas de sobrenadantes VAS de las células que expresan la construcción de proteína BS322 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) usando métodos y reactivos convencionales conocidos en la técnica (geles discontinuos de Laemmli) o mediante espectrometría de masas.

**F. Purificación.** La purificación de la proteína BS322 que contiene la secuencia FLAG se realiza mediante cromatografía de inmunoafinidad usando una matriz de afinidad que comprende anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 unido covalentemente a agarosa por enlace hidrazida (Eastman Kodak Co., New Haven, CT). Antes de la purificación por afinidad, la proteína en las recolecciones de medio VAS combinadas de frascos rotatorios se cambia a Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), tampón NaCl 150 mM usando una columna Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Suecia). La proteína en este tampón se aplica a la columna de afinidad con anticuerpo anti-FLAG M2. La proteína no unida se eluye por lavado de la columna con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), tampón NaCl 150 mM. La proteína unida se eluye usando un exceso de péptido FLAG en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM. El exceso de péptido FLAG puede eliminarse de la proteína BS322 purificada mediante electroforesis en gel o HPLC.

Aunque se utiliza el plásmido 577 en este ejemplo, los expertos en la materia saben que pueden utilizarse otros sistemas de expresión comparables, tales como CMV, en este documento con modificaciones apropiadas en los reactivos y/o técnicas y están dentro de las habilidades del experto en la materia.

El inserto clonado de mayor tamaño que contiene la región codificante del gen de BS322 se subclona después en (i) un vector de expresión eucariota que puede contener, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV) y/o secuencias que pueden fusionarse con proteínas que ayudan a la expresión y detección de proteína o (ii) un vector de expresión bacteriano que contenga una superóxido-dismutasa (SOD) y CMP-KDO sintetasa (CKS) u otro gen de fusión con proteína para la expresión de la secuencia proteica. Se describen métodos y vectores que son útiles para la producción de polipéptidos que contienen secuencias de fusión de SOD en el documento EPO 0196056, publicado el 1 de octubre de 1986, y los que contienen secuencias de fusión de CKS se describen en la Publicación EPO N° 0331961, publicada el 13 de septiembre de 1989. Esta proteína purificada de este modo puede usarse en una diversidad de técnicas, incluyendo pero sin limitación, estudios de inmunización de animales, inmunoensayos de fase sólida, etc.

#### Ejemplo 11b

##### *Expresión de Proteína en una Línea Celular Usando pcDNA3.1/Myc-His*

A. *Construcción de un Plásmido de Expresión de BS322.* Se ha construido el plásmido pcDNA3.1/Myc-His (N° Cat. V855-20, Invitrogen, Carlsbad, CA) en el pasado para la expresión de antígenos secretados por la mayoría de líneas celulares de mamífero. Insertos de proteína expresada se fusionan con una etiqueta peptídica myc-his. La etiqueta myc-his (SECUENCIA ID 30) comprende un epítipo de la oncoproteína c-myc y una secuencia polihistidina que son útiles para la purificación de una proteína de fusión expresada usando columnas de afinidad anti-myc o anti-his, o columnas de unión a metaloproteína. Los plásmidos para la expresión de proteínas BS322 secretables se construyen por inserción de una secuencia polinucleotídica de BS322 seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y fragmentos o complementarias de las mismas. Antes de la construcción de un plásmido de expresión de BS322, la secuencia de ADNc de BS322 se clona primera en un vector pCR<sup>®</sup>-Blunt de la forma siguiente:

El fragmento de ADNc de BS322 se genera por PCR usando procedimientos convencionales. Por ejemplo, la PCR se realiza con procedimientos y reactivos de Stratagene<sup>®</sup>, Inc. (La Jolla, CA), según indica el fabricante. Se usan cebadores de PCR a una concentración final de 0,5  $\mu$ M. Se realiza una PCR usando 5 U de pfu polimerasa (Stratagene, La Jolla, CA) sobre el molde de plásmido de BS322 (véase el Ejemplo 2) en una reacción de 50  $\mu$ l durante 30 ciclos (94°C, 1 min; 65°C, 1,5 min; 72°C, 3 min) seguidos de un ciclo de extensión de 72°C durante 8 min. (La secuencia de cebador de PCR sentido comprende nucleótidos que son complementarios al vector pINCY directamente cadena arriba del inserto génico de BS322 o que incorporan un sitio de restricción EcoRI 5', un iniciador consenso de la traducción de proteína cadena abajo adyacente y una secuencia de ácido nucleico 3' que está en el mismo sentido que el extremo más 5' del inserto de ADNc de BS322. El cebador de PCR antisentido incorpora una secuencia de restricción NotI 5' y una secuencia complementaria al extremo 3' del inserto de ADNc de BS322 justo cadena arriba del extremo más 3', el codón de terminación en fase de lectura.) Cinco microlitros (5  $\mu$ l) del producto de PCR con extremos romos resultante se ligan en 25 ng de vector pCR<sup>®</sup>-Blunt linealizado (Invitrogen, Carlsbad, CA) interrumpiendo el gen letal ccdB del vector. El vector ligado resultante se transforma en *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un Kit de Transformación One Shot<sup>™</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se cultivan en placas de selección LB-Kan (kanamicina 50  $\mu$ g/ml) a 37°C. Sólo las células que contienen un plásmido con un gen ccdB interrumpido crecerán después de la transformación [Grant, S.G.N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4645-4649 (1990)]. Se escogen colonias transformadas y se cultivan en 3 ml de caldo LB-Kan a 37°C. Se aísla el ADN plasmídico mediante el uso de un procedimiento QIAprep<sup>®</sup> (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) según indica el fabricante. El ADN se corta con EcoRI o SnaBI y enzimas de restricción NotI para liberar el fragmento de inserto de BS322. El fragmento se procesa en un gel de agarosa Seakem<sup>®</sup> LE al 1%/bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/ml/TE, se visualiza por irradiación UV, se escinde y se purifica usando procedimientos QIAquick<sup>™</sup> (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) según se indica en las instrucciones del proveedor.

El ADN plasmídico de pcDNA3.1/Myc-His se linealiza por digestión con EcoRI o SnaBI y NotI en la región polienlazadora del ADN plasmídico. La cadena principal de ADN plasmídico resultante permite la inserción del fragmento de ADNc purificado de BS322 anterior cadena abajo de un promotor de CMV que dirige la expresión de las proteínas en células de mamífero. El plásmido ligado se transforma en células DH5 alfa<sup>™</sup> (GibcoBRL Grand Island, NY) según se indica por el fabricante. En resumen, se añaden 10 ng de pcDNA3.1/Myc-His que contiene un inserto de BS322 a 50  $\mu$ l de células de DH5 alfa competentes y el contenido se mezcla suavemente. La mezcla se incuba en hielo durante 30 min, se somete a choque térmico durante 20 s a 37°C y se pone en hielo durante 2 min adicionales. Tras la adición de 0,95 ml de medio LB, la mezcla se incuba durante 1 h a 37°C con agitación a 225 rpm. Las células transformadas se siembran después en placas de LB/Amp (ampicilina 50  $\mu$ g/ml) de 100 mm y se cultivan a 37°C. Las colonias se escogen y se cultivan en 3 ml de caldo LB/Amp. El ADN plasmídico se purifica usando un Kit QIAprep. La presencia del inserto se confirma usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, digestión con enzimas de restricción y análisis en gel (J. Sambrook *et al.*, anteriormente).

B. *Transfección de Células 293 de Células de Riñón Embrionarias Humanas.* El plásmido de expresión de BS322 descrito en la sección A anterior se vuelve a transformar en células DH5 alfa sembradas en agar LB/ampicilina y se cultivan en 10 ml de caldo LB/ampicilina como se ha descrito anteriormente en este documento. El plásmido se purifica usando un Maxi Kit QIAfilter<sup>™</sup> (Qiagen, Chatsworth, CA) y se usa para transfectar células HEK293 [F.L. Graham *et al.*, J. Gen. Vir. 36: 59-72 (1977)]. Estas células están disponibles en la A.T.C.C. 10801 University Blvd., Manassas, VA con el N° de Acceso CRL 1573. La transfección se realiza usando el procedimiento mediado por lipofectamina catiónico descrito por P. Hawley-Nelson *et al.*, Focus 15.73 (1993). Particularmente, se cultivan células HEK293 en

## ES 2 343 103 T3

10 ml de medio de DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS), L-glutamina (2 mM) y se siembran recién preparadas en placas de cultivo de 100 mm a una densidad de  $9 \times 10^6$  células por placa. Las células se cultivan a 37°C hasta una confluencia de entre el 70% y el 80% para la transfección. Se añaden ocho microgramos (8 µg) de ADN plasmídico a 800 µl de medio Opti-MEM I® (Gibco-BRL, Grand Island, NY) y se añaden 48-96 µl de Reactivo de Lipofectamina™ (Gibco-BRL, Grand Island, NY) a una segunda parte de 800 µl de medio Opti-MEM I. Las dos soluciones se mezclan y se incuban a temperatura ambiente durante 15-30 min. Después de que se retire el medio de cultivo de las células, las células se lavan una vez con 10 ml de DMEM sin suero. La solución de ADN plasmídico-Lipofectamina-Opti-MEM I se diluye con 6,4 ml de DMEM sin suero y después se pone sobre las células. Las células se incuban durante 5 h a 37°C, tiempo después del cual se añaden 8 ml adicionales de DMEM con FBS al 20%. Después de 18-24 h, el medio antiguo se aspira y las células se cubren con 5 ml de DMEM recién preparado con FBS al 5%. Los sobrenadantes y extractos celulares se analizan para determinar la actividad génica de BS322 72 h después de la transfección.

C. *Análisis de Expresión de Antígeno de Gen BS322 en Tejido de Mama.* El sobrenadante de cultivo anterior se transfiere a criotubos y se almacena en hielo. Las células HEK293 se recogen lavándolas dos veces con 10 ml de PBS de Dulbecco frío y se lisan por adición de 1,5 ml de tampón de lisis CAT (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN), seguido de incubación durante 30 min a temperatura ambiente. El lisado se transfiere a tubos de microfuga de polipropileno de 1,7 ml y se centrifuga a 1000 x g durante 10 min. El sobrenadante se transfiere a nuevos criotubos y se almacena en hielo. Se analizan alícuotas de sobrenadantes de las células y el lisado de las células que expresan la construcción de proteína BS322 se analiza para determinar la presencia de proteína recombinante de BS322. Las alícuotas pueden procesarse en electroforesis en gel de poliácridamida-SDS (SDS-PAGE) usando métodos y reactivos convencionales conocidos en la técnica (J. Sambrook *et al.*, anteriormente). Estos geles pueden transferirse después sobre un medio sólido tal como nitrocelulosa, nitrano, etc., y la banda de proteína BS322 puede visualizarse usando técnicas de transferencia de Western con anticuerpos monoclonales anti-epítipo myc o anti-histidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) o suero policlonal anti-BS322 (véase el Ejemplo 14). Como alternativa, la proteína recombinante BS322 expresada puede analizarse por espectrometría de masas (véase el Ejemplo 12).

D. *Purificación.* La purificación de la proteína recombinante BS322 que contiene la secuencia myc-his se realiza usando el sistema de cromatografía de afinidad Xpress® (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene una resina de agarosa cargada con níquel que se une específicamente a restos polihistidina. Sobrenadantes de placas de 10 x 100 mm preparados como se ha descrito anteriormente se combinan y se pasan sobre la columna cargada con níquel. La proteína no unida se eluye por lavado de la columna con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)/tampón NaCl 150 mM, dejando sólo las proteínas de fusión con myc-his. Después, la proteína recombinante BS322 unida se eluye de la columna usando un exceso de imidazol o histidina o un tampón de bajo pH. Como alternativa, la proteína recombinante también puede purificarse por unión en la secuencia myc-his a una columna de afinidad que consiste en anticuerpos monoclonales anti-myc o anti-histidina conjugados por medio de un enlace hidrazida o de otro tipo a una resina de agarosa y elución con un exceso de péptido o histidina myc, respectivamente.

Después, la proteína recombinante purificada puede entrecruzarse covalentemente con una fase sólida, tal como columnas de Sepharose activadas con *N*-hidroxisuccinimida (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), según se indica por las instrucciones del proveedor. Estas columnas que contienen proteína recombinante BS322 unida covalentemente pueden usarse después para purificar anticuerpos anti-BS322 de sueros de conejo o ratón (véanse los Ejemplos 13 y 14).

E. *Recubrimiento de Placas de Microtitulación con Proteínas Expresadas BS322.* El sobrenadante de una placa de 100 mm, como se ha descrito anteriormente, se diluye en un volumen apropiado de PBS. Después, se ponen 100 µl de la mezcla resultante en cada pocillo de una placa de microtitulación quelada con metal Reacti-Bind™ (Pierce, Rockford, IL), se incuba a temperatura ambiente con agitación y se continúa con tres lavados con 200 µl cada uno de PBS con Tween® 20 al 0,05%. La placa de microtitulación preparada puede usarse después para explorar antisueros policlonales para determinar la presencia de anticuerpos de BS322 (véase el Ejemplo 17).

Aunque se utiliza el pcDNA3.1/Myc-His en este ejemplo, los expertos en la materia saben que pueden utilizarse otros sistemas de expresión comparables en este documento con modificaciones apropiadas en reactivos y/o técnicas y están dentro de las habilidades del experto en la materia. El inserto clonado de mayor tamaño que contiene la región codificante del gen de BS322 se subclona en (i) un vector de expresión eucariota que puede contener, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV) y/o secuencias que pueden fusionarse con proteínas que ayudan a la expresión y detección de proteína o (ii) un vector de expresión bacteriano que contiene superóxido-dismutasa (SOD) y CMP-KDO sintetasa (CKS) u otro gen de fusión con proteína para la expresión de la secuencia proteica. Se describen métodos y vectores que son útiles para la producción de polipéptidos que contienen secuencias de fusión de SOD en la solicitud EPO publicada N° EP 0 196 056, publicada el 1 de octubre de 1986, y se describen vectores que contienen secuencias de fusión de CKS en la solicitud EPO publicada N° EP 0 331 961, publicada el 13 de septiembre de 1989. La proteína purificada puede usarse en una diversidad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, estudios de inmunización de animales, inmunoensayos de fase sólida, etc.

65

## Ejemplo 12

*Análisis Químico de Proteínas Tisulares de Mama*

5 A. *Análisis de Fragmentos Peptídicos Tratados con Tripsina Usando MS.* Sueros de pacientes con una enfermedad de mama, tal como cáncer de mama, sueros de pacientes sin enfermedad de mama, extractos de tejidos o células de mama de pacientes con una enfermedad de mama, tal como cáncer de mama, extractos de tejidos o células de mama de pacientes sin enfermedad de mama y extractos de tejidos o células de otros órganos enfermos o no enfermos de pacientes se procesan en un gel de poliacrilamida usando procedimientos convencionales y se tiñen con Azul de Coomassie. Las secciones del gel sospechosas de contener el polipéptido desconocido se esciden y se someten a una reducción, acetamidación y digestión con tripsina dentro del gel. P. Jenó *et al.*, *Anal. Bio.* 224: 451-455 (1995) y J. Rosenfeld *et al.*, *Anal. Bio.* 203:173-179 (1992). Las secciones del gel se lavan  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM y acetonitrilo. Los fragmentos de gel encogidos se hinchan en tampón de digestión ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM y tripsina 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a 4°C durante 45 min. El sobrenadante se aspira y se sustituye con de 5 a 10  $\mu\text{l}$  de tampón de digestión sin tripsina y se deja incubar durante una noche a 37°C. Los péptidos se extraen con 3 cambios de ácido fórmico al 15 5% y acetonitrilo y se evaporan hasta sequedad. Los péptidos se adsorben a aproximadamente 0,1  $\mu\text{l}$  de adsorbente POROS R2 (PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts) inmovilizado en la punta de un tubo capilar de cromatografía de gases extraídos disolviéndolos en 10  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 5% y pasándolos a través del capilar. Los péptidos adsorbidos se lavan con agua y se eluyen con ácido fórmico al 5% en metanol al 60%. El eluyente se pasa directamente hacia el capilar de nebulización de un espectrómetro de masas API III (Perkin-Elmer Sciex, Thornhill, Ontario, Canadá) para su análisis por espectrometría de masas por nanoelectronebulización. M. Wilm *et al.*, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process* 136:1 67-180 (1994) y M. Wilm *et al.*, *Anal. Chem.* 66: 1-8 (1994). Las masas de los péptidos tratados con tripsina se determinan a partir del espectro de masas obtenido del primer cuadrupolo. Las masas correspondientes a los péptidos esperados pueden analizarse adicionalmente en modo MS/MS para dar la secuencia de aminoácidos del péptido.

B. *Análisis de Fragmentos Peptídicos Usando LC/MS.* La presencia de polipéptidos esperados a partir de secuencias de ARNm encontradas en tejidos enfermos hiperplásicos también puede confirmarse usando cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS). D. Hess *et al.*, *METHODS, A Companion to Methods in Enzymology* 6: 227-238 (1994). La muestra de suero o extracto tumoral del paciente se desnaturaliza con SDS y se reduce con ditiotreitól (1,5 mg/ml) durante 30 min a 90°C seguido de alquilación con yodoacetamida (4 mg/ml) durante 15 min a 25°C. Después de la electroforesis en acrilamida, los polipéptidos se electrotransfieren a una membrana catiónica y se tiñen con Azul de Coomassie. Después de la tinción, las membranas se lavan y las secciones que se piensa que contienen los polipéptidos desconocidos se retiran por corte y se diseccionan en fragmentos pequeños. Las membranas se ponen en tubos de microcentrífuga de 500  $\mu\text{l}$  y se sumergen en de 10 a 20  $\mu\text{l}$  de tampón de digestión proteolítico (Tris-HCl 100 mM, pH 8,2, que contiene NaCl 0,1 M, acetonitrilo al 10%,  $\text{CaCl}_2$  2 mM y tripsina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma, St. Louis, MO). Después de 15 h a 37°C, se añaden 3  $\mu\text{l}$  de urea saturada y 1  $\mu\text{l}$  de tripsina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incuban durante 5 h adicionales a 37°C. La mezcla de digestión se acidifica con 3  $\mu\text{l}$  de ácido trifluoroacético al 10% y se centrifuga para separar el sobrenadante de la membrana. El sobrenadante se inyecta directamente en un microorificio de columna de HPLC de fase inversa y se eluye con un gradiente lineal de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 40 0,05%. El eluido se suministra directamente en un espectrómetro de masas por electronebulización, después se pasa a través de un divisor de corrientes si es necesario para ajustar el volumen de material. Los datos se analizan siguiendo los procedimientos expuestos en el Ejemplo 12, Sección A.

## Ejemplo 13

*Protocolo de Inmunización Génica*

A. *Expresión de Antígeno In Vivo.* La inmunización génica evita las etapas de purificación de proteína expresando directamente un antígeno *in vivo* después de la inoculación del vector de expresión apropiado. Además, la producción de antígeno por este método puede permitir un plegamiento y una glicosilación correctos de la proteína, puesto que la proteína se produce en tejido de mamífero. El método utiliza la inserción de la secuencia génica en un plásmido que contiene un promotor de CMV, la expansión y purificación del plásmido y la inyección del ADN plasmídico en el tejido muscular de un animal. Los animales preferidos incluyen ratones y conejos. Véase, por ejemplo, H. Davis *et al.*, *Human Molecular Genetics* 2: 1847-1851 (1993). Después de una o dos inmunizaciones de refuerzo, puede extraerse sangre del animal, recogerse líquido ascítico o puede extirparse del bazo del animal para la producción de hibridomas.

B. *Preparación y Purificación de Plásmido.* Se generan secuencias de ADNc de BS322 a partir del vector que contiene ADNc de BS322 usando cebadores de PCR apropiados PCR que contienen sitios de restricción 5' adecuados siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 11. El producto de PCR se corta con enzimas de restricción apropiadas y se inserta en un vector que contiene el promotor de CMV (por ejemplo, vectores pRc/CMV o pcDNA3 de Invitrogen, San Diego, CA). Después, este plásmido se expande en la cepa bacteriana apropiada y se purifica a partir del lisado celular usando un gradiente de CsCl o una columna de purificación de ADN plasmídico de Qiagen. 65 Todas estas técnicas son familiares para un experto en la técnica de biología molecular.

C. *Protocolo de Inmunización.* Se inmunizan animales anestesiados por vía intramuscular con 0,1-100  $\mu\text{g}$  del plásmido purificado diluido en PBS u otros potenciadores de la captación de ADN (Cardiotoxina, sacarosa al 25%).

## ES 2 343 103 T3

Véase, por ejemplo, H. Davis *et al.*, Human Gene Therapy 4: 733-740 (1993); y P. W. Wolff *et al.*, Biotechniques 11: 474-485 (1991). Se administran de una a dos inyecciones de refuerzo a intervalos mensuales.

D. *Ensayo y Uso de Antisuero*. Se extrae sangre de los animales y los sueros resultantes se ensayan para anticuerpos usando péptidos sintetizados a partir de la secuencia génica conocida (véase el Ejemplo 16) usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como técnicas de transferencia de Western o EIA. Los anticuerpos producidos por este método pueden usarse después para detectar la presencia del antígeno en el extracto tisular o celular de un paciente o en el suero de un paciente mediante técnicas de ELISA o transferencia de Western, tales como las descritas en los Ejemplos 15 a 18.

### Ejemplo 14

#### *Producción de Anticuerpos Contra BS322*

A. *Producción de Antiseros Policlonales*. Se prepararon antiseros contra BS322 por inyección de conejos con péptidos cuyas secuencias se obtuvieron a partir de la secuencia de aminoácidos esperada de la secuencia de nucleótidos consenso de BS322 (SECUENCIA ID N° 9). La síntesis de péptidos (SECUENCIA ID N° 26 y SECUENCIA ID N° 28) se describe en el Ejemplo 10. El péptido de la SECUENCIA ID N° 26 se conjugó con un transportador tal como hemocianina de lapa californiana (KLH). El péptido de la SECUENCIA ID N° 28 no se conjugó con un transportador.

1. *Conjugación de Péptido*. Los péptidos pueden conjugarse con hemocianina de lapa californiana activada con maleimida (KLH, disponible en el mercado como Imject<sup>®</sup>, disponible en Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Imject<sup>®</sup> contiene aproximadamente 250 moles de grupos maleimida reactivos por mol de hemocianina. La KLH activada se disuelve en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 8,4) a una concentración de aproximadamente 7,7 mg/ml. El péptido se conjuga por medio de cisteínas que aparecen en la secuencia peptídica o a una cisteína previamente añadida al péptido sintetizado para proporcionar un punto de unión. El péptido se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) y se hace reaccionar con la KLH activada a una proporción molar de aproximadamente 1,5 moles de péptido por mol de maleimida reactivada unida a la KLH. Se proporciona en este documento a continuación un procedimiento para la conjugación de péptido (SECUENCIA ID N° 26). El experto en la materia sabe que las cantidades, tiempos y condiciones de dicho procedimiento pueden variarse para optimizar la conjugación de péptido.

La reacción de conjugación descrita en este documento a continuación se basa en la obtención de 3 mg de conjugado de péptido con KLH ("péptido conjugado"), que contiene aproximadamente 0,77  $\mu$ moles de grupos maleimida reactivos. Esta cantidad de conjugado de péptido habitualmente es adecuada para una inyección primaria y cuatro inyecciones de refuerzo para la producción de antiseros policlonales en un conejo. En resumen, se disuelve péptido (tal como SECUENCIA ID N° 26) en DMSO a una concentración de 1,16  $\mu$ moles/100  $\mu$ l de DMSO. Se añaden cien microlitros (100  $\mu$ l) de la solución de DMSO a 380  $\mu$ l de la solución de KLH activada preparada como se ha descrito en este documento anteriormente y se añaden 20  $\mu$ l de PBS (pH 8,4) para llevar el volumen a 500  $\mu$ l. La reacción se incuba durante una noche a temperatura ambiente con agitación. El grado de reacción se determina midiendo la cantidad de tiol sin reaccionar en la mezcla de reacción. La diferencia entre la concentración de partida de tiol y la concentración final se asume que es la concentración de péptido que se ha acoplado a la KLH activada. La cantidad de tiol restante se mide usando reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Se preparan patrones de cisteína a una concentración de 0, 0,1, 0,5, 2,5 y 20 mM por disolución de 35 mg de cisteína HCl (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) en 10 ml de PBS (pH 7,2) y dilución de la solución madre a la concentración o concentraciones deseadas. La determinación fotométrica de la concentración de tiol se logra poniendo 200  $\mu$ l de PBS (pH 8,4) en cada pocillo de una placa de micropocillos Immulon 2<sup>®</sup> (Dyner Technologies, Chantilly, VA). A continuación, se añaden 10  $\mu$ l de mezcla patrón o de reacción a cada pocillo. Por último, se añaden 20  $\mu$ l de reactivo de Ellman a una concentración de 1 mg/ml en PBS (pH 8,4) a cada pocillo. Los pocillos se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lee la absorbancia de todos los pocillos a 415 nm con un lector de microplacas (tal como el BioRad Model 3550, BioRad, Richmond, CA). La absorbancia de los patrones se usa para construir una curva patrón y la concentración de tiol de la mezcla de reacción se determina a partir de la curva patrón. Una disminución en la concentración de tiol libre es indicativa de una reacción de conjugación con éxito. Se elimina el péptido sin reaccionar por diálisis contra PBS (pH 7,2) a temperatura ambiente durante 6 horas. El conjugado se almacena a 2-8°C si se va a usar inmediatamente; de otro modo, se almacena a -20°C o a una temperatura menor.

2. *Inmunización de Animales*. Se usaron conejos New Zealand blancos hembra que pesaban 2 kg o más para la generación de antisuero policlonal. Se inmunizó un animal por péptido conjugado o sin conjugar (preparado como se ha descrito en este documento anteriormente). Una semana antes de la primera inmunización, se obtuvieron de 5 a 10 ml de sangre del animal para servir como muestra no inmune previa a las extracciones de sangre.

Los péptidos, SECUENCIA ID N° 26 (conjugado y sin conjugar) y SECUENCIA ID N° 28 (sin conjugar) se usaron para preparar el inmunógeno primario por emulsión de 0,5 ml del péptido a una concentración de 2 mg/ml en PBS (pH 7,2) que contenía 0,5 ml de adyuvante completo de Freund (CFA) (Difco, Detroit, MI). El inmunógeno se inyectó en varios sitios del animal por las vías de administración subcutánea, intraperitoneal, y/o intramuscular.

Cuatro semanas después de la inmunización primaria, se administró una inmunización de refuerzo. El inmunógeno usado para la dosis de inmunización de refuerzo se preparó por emulsión de 0,5 ml del mismo péptido conjugado o sin conjugar usado para el inmunógeno primario, excepto por que el péptido se diluyó ahora hasta 1 mg/ml con 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Difco, Detroit, MI). De nuevo, la dosis de refuerzo se administró en varios sitios por tipos de inyecciones subcutánea, intraperitoneal e intramuscular. Se extrajo sangre de los animales (5 ml) dos semanas después de la inmunización de refuerzo y el suero se ensayó para determinar la inmunorreactividad contra el péptido, como se describe a continuación. El programa de refuerzo y extracción de sangre se repitió a intervalos de 4 semanas hasta que se obtuvo un título adecuado. El título o concentración de antisuero se determinó mediante EIA de microtitulación como se describe en el Ejemplo 17 a continuación. Un título de anticuerpo de 1:500 o superior se consideraba un título adecuado para su uso y estudio adicional.

TABLA 1

*Título de antisuero de conejo anti-péptido BS322 (extracción de sangre semana 11)*

Inmunógeno Peptídico	Título
SECUENCIA ID Nº 26 (conjugado)	>62.500
SECUENCIA ID Nº 26 (sin conjugar)	>62.500
SECUENCIA ID Nº 28 (sin conjugar)	30.600

#### B. Producción de Anticuerpo Monoclonal

1. *Protocolo de Inmunización.* Se inmunizan ratones usando inmunógenos preparados como se ha descrito anteriormente en este documento, excepto por que la cantidad del péptido conjugado o sin conjugar para la producción de anticuerpo monoclonal en ratones es de un décimo la cantidad usada para producir antisueños policlonales en conejos. Por lo tanto, el inmunógeno primario consiste en 100 µg de péptido conjugado o sin conjugar en 0,1 ml de emulsión de CFA; mientras que el inmunógeno usado para inmunizaciones de refuerzo consiste en 50 µg de péptido conjugado o sin conjugar en 0,1 ml de IFA. Se preparan hibridomas para la generación de anticuerpos monoclonales y se exploran usando técnicas convencionales. Los métodos usados para el desarrollo de anticuerpos monoclonales siguen procedimientos conocidos en la técnica tales como los detallados en Kohler y Milstein, *Nature* 256: 494 (1975) y revisados en J. G. R. Hurrell, ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1982). Otro método de desarrollo de anticuerpos monoclonales que se basa en el método de Kohler y Milstein es el de L.T. Mimms *et al.*, *Virology* 176: 604-619 (1990).

El régimen de inmunización (por ratón) consiste en una inmunización primaria con inmunizaciones de refuerzo adicionales. El inmunógeno primario usado para la inmunización primaria consiste en 100 µg de péptido conjugado o sin conjugar en 50 µl de PBS (pH 7,2) previamente emulsionado en 50 µl de CFA. Las inmunizaciones de refuerzo realizadas a aproximadamente dos semanas y cuatro semanas después de la inmunización primaria consisten en 50 µg de péptido conjugado o sin conjugar en 50 µl de PBS (pH 7,2) emulsionados con 50 µl de IFA. Un total de 100 µl de este inmunógeno se inoculan por vía intraperitoneal y subcutánea en cada ratón. Se exploran ratones individuales para determinar la respuesta inmune por inmunoensayo enzimático en placa de microtitulación (EIA) como se describe en el Ejemplo 17, aproximadamente cuatro semanas después de la tercera inmunización. Los ratones se inoculan por vía intravenosa, intraesplénica o intraperitoneal con 50 µg de péptido conjugado o sin conjugar en PBS (pH 7,2) aproximadamente quince semanas después de la tercera inmunización.

Tres días después de este refuerzo intravenoso, los esplenocitos se fusionan con, por ejemplo, células de mieloma Sp2/0-Ag14 (Milstein Laboratories, Inglaterra) usando el método de polietilenglicol (PEG). Las fusiones se cultivan en Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) que contiene suero fetal de ternera al 10% (FCS), más hipoxantina al 1%, aminopterina y timidina (HAT). Se exploran cultivos a granel por EIA en placa de microtitulación siguiendo el protocolo del Ejemplo 17. Los clones reactivos con el péptido usado como inmunógeno y no reactivos con otros péptidos (es decir, péptidos de BS322 no usados como inmunógeno) se seleccionan para una expansión final. Por lo tanto, los clones seleccionados se expanden, se dividen en alícuotas y se congelan en IMDM que contiene FCS al 10% y dimetilsulfóxido al 10%.

2. *Producción de Líquido Ascítico que contiene Anticuerpos Monoclonales.* Células de hibridoma congeladas preparadas como se ha descrito anteriormente en este documento se descongelan y se ponen en cultivo de expansión. Se inoculan células de hibridoma viables por vía intraperitoneal en ratones tratados con Pristano. Se extrae líquido ascítico de los ratones, se combina, se filtra a través de un filtro de 0,2 µm y se somete a un análisis de inmunoglobulina clase G (IgG) para determinar el volumen de la columna de Proteína A necesario para la purificación.

3. *Purificación de Anticuerpos Monoclonales a partir de Líquido Ascítico.* En resumen, el líquido ascítico filtrado y descongelado se mezcla con un volumen equivalente de tampón de unión a Proteína A Sepharose (glicina 1,5 M, NaCl 3,0 M, pH 8,9) y se vuelve a filtrar a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m. El volumen de la columna de Proteína A se determina por la cantidad de IgG presente en el líquido ascítico. Después, el eluido se dializa contra PBS (pH 7,2) durante una noche a 2-8°C. El anticuerpo monoclonal dializado se esteriliza por filtración y se dispensa en alícuotas. La inmunorreactividad del anticuerpo monoclonal purificado se confirma determinando su capacidad para unirse específicamente al péptido usado como el inmunógeno por uso del procedimiento de ensayo en placa de microtitulación de EIA del Ejemplo 17. La especificidad del anticuerpo monoclonal purificado se confirma por determinación de su ausencia de unión a péptidos irrelevantes, tales como péptidos BS322 no usados como inmunógeno. El monoclonal anti-BS322 purificado preparado de este modo y caracterizado se pone a 2-8°C para almacenamiento a corto plazo o a -80°C para almacenamiento a largo plazo.

4. *Caracterización Adicional de Anticuerpo Monoclonal.* El isotipo y subtipo del anticuerpo monoclonal producido como se ha descrito anteriormente en este documento puede determinarse usando kits disponibles en el mercado (disponibles en Amersham. Inc., Arlington Heights, IL). También puede realizarse un ensayo de la estabilidad del anticuerpo monoclonal poniendo una alícuota del anticuerpo monoclonal en almacenamiento continuo a 2-8°C y ensayando las lecturas de densidad óptica (DO) durante el transcurso de un periodo de tiempo dado.

C. *Uso de Proteínas Recombinantes como Inmunógenos.* Dentro del alcance de la presente invención se incluye que las proteínas recombinantes preparadas como se describe en este documento pueden utilizarse como inmunógenos en la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales, con cambios correspondientes en reactivos y técnicas conocidas por los expertos en la materia.

#### Ejemplo 15

##### *Purificación de Anticuerpos de Suero que se Unen Específicamente a Péptidos BS322*

Sueros inmunes obtenidos como se ha descrito anteriormente en este documento en los Ejemplos 13 y/o 14 se purifican por afinidad usando péptidos sintéticos inmovilizados preparados como se describe en el Ejemplo 10 o proteínas recombinantes preparadas como se describe en el Ejemplo 11. Se obtiene una fracción IgG del antisuero pasando el antisuero bruto diluido sobre una columna de Proteína A (Affi-Gel proteína A, Bio-Rad, Hercules, CA). La elución con un tampón (Tampón de Unión, suministrado por el fabricante) elimina sustancialmente todas las proteínas que no sean inmunoglobulinas. La elución con glicina tamponada 0,1 M (pH 3) proporciona una preparación de inmunoglobulina que está sustancialmente libre de albúmina y otras proteínas del suero.

Se realiza cromatografía de inmutafinidad para obtener una preparación con una mayor fracción de anticuerpo de unión a antígeno específico. El péptido usado para generar el antisuero se inmoviliza en una resina de cromatografía y los anticuerpos específicos dirigidos contra sus epítopos se adsorben a la resina. Después de eliminar por lavado los componentes no unidos, los anticuerpos específicos se eluyen con tampón de glicina 0,1 M, pH 2,3. Las fracciones de anticuerpo se neutralizan inmediatamente con tampón Tris 1,0 M (pH 8,0) para preservar la inmunorreactividad. La resina de cromatografía seleccionada depende de los grupos reactivos presentes en el péptido. Si el péptido tiene un grupo amino, se usa una resina tal como Affi-Gel 10 o Affi-Gel 15 (Bio-Rad, Hercules, CA). Si se desea el acoplamiento a través de un grupo carboxi en el péptido, puede usarse Affi-Gel 102 (Bio-Rad, Hercules, CA). Si el péptido tiene un grupo sulfhidrilo libre, puede usarse una resina organomercurial, tal como Affi-Gel 501 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Como alternativa, pueden extirparse bazos y usarse en la producción de hibridomas para producir anticuerpos monoclonales siguiendo métodos de rutina conocidos en la técnica como se ha descrito anteriormente en este documento.

#### Ejemplo 16

##### *Transferencia de Western de Muestras Tisulares*

Se preparan extractos de proteína por homogenización de muestras de tejido en Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5), glicerol al 15% (p/v), EDTA 0,2 mM, 1,4-ditiotreitol 1,0 mM, leupeptina 10  $\mu$ g/ml y fenilmetilsulfonilfluoruro 1,0 mM [Kain *et al.*, Biotechniques, 17: 982 (1994)]. Después de la homogenización, los homogeneizados se centrifugan a 4°C durante 5 minutos para separar el sobrenadante del residuo. Se vuelven a extraer los residuos por homogeneización con un tampón que es similar al anterior pero también contiene tricina 0,1 M y SDS al 0,1%. El sobrenadante de la segunda extracción se usa para transferencia de Western. Para la cuantificación de proteína, se añaden 2-5  $\mu$ l de sobrenadante a 1,5 ml de Reactivo de Proteína de Coomassie (Pierce, Rockford, IL) y se mide la absorbancia resultante a 595 nm.

Para SDS-PAGE, las muestras se ajustan a la concentración de proteína deseada con Tampón Tricina (Novex, San Diego, CA), se mezclan con un volumen equivalente de tampón de muestras Tricina 2X (Novex, San Diego, CA) y se calientan durante 5 minutos a 100°C en un termociclador. Después, las muestras se aplican a un Gel de Tricina Premoldeado al 10-20% Novex para electroforesis. Después de la electroforesis, las muestras se transfieren desde los geles a membranas de nitrocelulosa en tampón de transferencia Tris-Glicina Novex. Después, las membranas se sondan con anticuerpos anti-péptido específicos usando los reactivos y procedimientos proporcionados en los kits de detección de

## ES 2 343 103 T3

quimioluminiscencia Western Lights o Western Lights Plus (Tropix, Bedford, MA). Las bandas quimioluminiscentes se visualizan por exposición de las membranas reveladas a Hyperfilm ECL (Amersham, Arlington Heights, IL).

5 Se llevan a cabo experimentos de competición de una forma análoga a la anterior con la excepción siguiente; los anticuerpos primarios (antisueros policlonales anti-péptido) se preincuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con concentraciones variables de inmunógeno peptídico antes de la exposición al filtro de nitrocelulosa. El revelado del Western se realiza como anteriormente.

10 Después de la visualización de las bandas en la película, las bandas también pueden visualizarse directamente en las membranas por adición y revelado de un sustrato cromogénico tal como 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP). Esta solución cromogénica contiene BCIP al 0,016% en una solución que contiene NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y Tris-HCl 100 mM (pH 9,5). El filtro se incubaba en la solución a temperatura ambiente hasta que se desarrollan las bandas a la intensidad deseada. Se realiza una determinación de masa molecular basándose en la movilidad de los patrones de peso molecular preteñidos (Novex, San Diego, CA) o patrones de peso molecular biotinilados (Tropix, Bedford, MA).

### Ejemplo 17

#### Ensayo de Placa de Microtitulación de EIA

20 La inmunorreactividad de antisuero obtenido de conejos como se describe en el Ejemplo 14 se determina por medio de EIA en placa de microtitulación de la forma siguiente. En resumen, péptidos sintéticos, SECUENCIA ID N° 26 y SECUENCIA ID N° 28, preparados como se describe en el Ejemplo 10 se disolvieron en tampón carbonato 50 mM (pH 9,6) a una concentración final de 2 µg/ml. A continuación, se pusieron 100 µl de la solución de péptido en cada pocillo de una placa de microtitulación Immulon 2® (Dynex Technologies, Chantilly, VA). La placa se incubó durante una noche a temperatura ambiente y después se lavó cuatro veces con agua desionizada. Los pocillos se bloquearon por adición de 125 µl de un agente de bloqueo de proteína adecuado tal como Superblock® (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) a cada pocillo y después se desechó inmediatamente la solución. Este procedimiento de bloqueo se realizó tres veces. Antisueros obtenidos de conejos inmunizados como se ha descrito anteriormente se diluyeron en un agente de bloqueo de proteína (por ejemplo, una solución Superblock® al 3%) en PBS que contenía Tween-20® al 0,05% (polioxietiléneter de monolaurato) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) y azida sódica al 0,05% a diluciones de 1:100, 1:500, 1:2500, 1:12.500 y 1:62.500 y se pusieron en cada pocillo de la placa de microtitulación recubierta. Los pocillos se incubaron después durante tres horas a temperatura ambiente. Cada pocillo se lavó cuatro veces con agua desionizada. Cien µl de antisuero de cabra anti-IgG de conejo o de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Southern Biotech, Birmingham, AB) diluido 1:2000 en solución Superblock® al 3% en solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20® al 0,05% y azida sódica al 0,05% se añadieron a cada pocillo. Los pocillos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, cada pocillo se lavó cuatro veces con agua desionizada. Después se añadieron cien microlitros (100 µl) de sustrato de fosfato de paranitrofenilo (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) a cada pocillo. Los pocillos se incubaron durante treinta minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 405 nm de cada pocillo. Se identificaron las reacciones positivas por aumento en la absorbancia a 405 nm en el pocillo de ensayo por encima de la absorbancia dada por un suero no inmune (control negativo). Una reacción positiva era indicativa de la presencia de anticuerpos anti-BS322 detectables. Se calcularon los títulos de los antisueros anti-péptido a partir de las diluciones descritas anteriormente de antisueros y se definieron como la dilución calculada, donde  $A_{405\text{ nm}} = 0,5\text{ DO}$ .

45 Además de los títulos, también pueden determinarse las afinidades aparentes [ $K_d(\text{ap})$ ] para algunos de los antisueros anti-péptido. Pueden usarse resultados de ensayo en placa de microtitulación de EIA para obtener las constantes de disociación aparente ( $K_d$ ) basándose en un análogo de la ecuación de Michaelis-Menten [V. Van Heyningen, *Methods in Enzymology*, Vol. 121, pág. 472 (1986) y que se describe adicionalmente en X. Qiu, *et al.*, *Journal of Immunology*, Vol. 156, pág. 3350 (1996)]:

$$55 \quad [Ag-Ab] = [Ag-Ab]_{\text{máx}} \times \frac{[Ab]}{[Ab] + K_d}$$

60 Donde [Ag-Ab] es la concentración de complejo de antígeno-anticuerpo,  $[Ag-Ab]_{\text{máx}}$  es la concentración de complejo máxima, [Ab] es la concentración de anticuerpo y  $K_d$  es la constante de disociación. Durante el ajuste de curva, la [Ag-Ab] se sustituye con el valor al que se le ha restado el fondo de la  $DO_{405\text{ nm}}$  a la concentración dada de Ab. Tanto la  $K_d$  como la  $[DO_{405\text{ nm}}]_{\text{máx}}$ , que se corresponde con la  $[Ag-Ab]_{\text{máx}}$ , se tratan como parámetros ajustados. El programa informático Origin puede usarse para el ajuste de curva.

65

## ES 2 343 103 T3

### Ejemplo 18

#### *Recubrimiento de Partículas de Fase Sólida*

5 A. *Recubrimiento de Micropartículas con Anticuerpos que se Unen Específicamente a Antígeno BS322.* Se recubren anticuerpos purificados por afinidad que se unen específicamente a proteína BS322 (véase el Ejemplo 15) sobre micropartículas de poliestireno, poliestireno carboxilado, polimetilacrilato o partículas similares que tienen un radio en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 20  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas pueden recubrirse de forma pasiva o activa. Un método de recubrimiento comprende el recubrimiento de micropartículas de látex carboxilado activado por EDAC  
10 (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) con anticuerpos que se unen específicamente a proteína BS322 de la forma siguiente. En resumen, se mezcla una suspensión de sólidos final del 0,375% de micropartículas de látex carboxilado lavado con resina (disponible en Bangs Laboratories, Carmel, IN o Serodyn, Indianápolis, IN) en una solución que contiene tampón MES 50 mM, pH 4,0 y 150 mg/l de anticuerpo anti-BS322 purificado por afinidad (véase el Ejemplo 14) durante 15 min en un recipiente apropiado. Se añade agente de acoplamiento EDAC a una concentración final de 5,5  $\mu\text{g/ml}$  a la mezcla y se mezcla durante 2,5 h a temperatura  
15 ambiente.

Después, las micropartículas se lavan con 8 volúmenes de un tampón de lavado fosfato sódico/Tween 20<sup>®</sup> (pH 7,2) por filtración de flujo tangencial usando un módulo de filtración Microgon de 0,2  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas lavadas se  
20 almacenan en un tampón apropiado que habitualmente contiene un tensioactivo diluido y proteína irrelevante como agente de bloqueo, hasta que sea necesario.

B. *Recubrimiento de Perlas de 6,35 mm.* También pueden recubrirse anticuerpos que se unen específicamente a antígeno BS322 sobre la superficie de perlas de poliestireno de 6,35 mm por métodos de rutina conocidos en la técnica (Snitman *et al.*, Patente de Estados Unidos 5.273.882) y usados en ensayos tipo sándwich de EIA o unión competitiva.  
25

Las perlas de poliestireno se limpian primero por ultrasonificación de las mismas durante aproximadamente 15 segundos en tampón NaHCO<sub>3</sub> 10 mM a pH 8,0. Después, las perlas se lavan en agua desionizada hasta que se eliminan todos los finos. Después las perlas se sumergen en una solución de anticuerpo en tampón carbonato 10 mM, de pH  
30 8 a 9,5. La solución de anticuerpo puede estar tan diluida como 1  $\mu\text{g/ml}$  en el caso de anticuerpos monoclonales de alta afinidad o tan concentrada como aproximadamente 500  $\mu\text{g/ml}$  para anticuerpos policlonales que no se han purificado por afinidad. Las perlas se recubren durante al menos 12 horas a temperatura ambiente y después se lavan con agua desionizada. Las perlas pueden secarse al aire o almacenarse húmedas (en PBS, pH 7,4). También pueden sobrerrecubrirse con estabilizantes de proteína (tales como sacarosa) o agentes de bloqueo de proteínas usados como  
35 bloqueantes de la unión inespecífica (tales como proteínas irrelevantes, leche desnatada Carnation, Superblock<sup>®</sup> o similar).

### Ejemplo 19

#### 40 *Inmunoensayo Enzimático de Micropartículas (MEIA)*

Se detectan antígenos BS322 en muestras de ensayo de pacientes realizando un EIA de competición de antígeno convencional o EIA tipo sándwich de anticuerpo y utilizando una fase sólida tal como micropartículas (MEIA). El ensayo puede realizarse en un analizador automático tal como el Analizador IMx<sup>®</sup> Analyzer (Abbott Laboratories,  
45 Abbott Park, IL).

A. *EIA de Tipo Sándwich de Anticuerpo.* En resumen, las muestras que se sospecha que contienen antígeno BS322 se incuban en presencia de micropartículas recubiertas con anticuerpo anti-BS322 (preparado como se describe en el Ejemplo 17) para formar complejos de antígeno/anticuerpo. Las micropartículas se lavan después y se añade un reactivo  
50 indicador que comprende un anticuerpo conjugado con un compuesto generador de señal (es decir, enzimas tales como fosfatasa alcalina o peróxido de rábano picante) a los complejos de antígeno/anticuerpo o las micropartículas y se incuban. Las micropartículas se lavan y los complejos de anticuerpo/antígeno/anticuerpo unidos se detectan por adición de un sustrato (por ejemplo, 4-metil umbeliferil fosfato (MUP) u OPD/peróxido, respectivamente), que reacciona con el compuesto generador de señal para generar una señal medible. Una señal elevada en la muestra de ensayo en  
55 comparación con la señal generada por un control negativo detecta la presencia de antígeno BS322. La presencia de antígeno BS322 en la muestra de ensayo es indicativa de un diagnóstico de una enfermedad o afección de la mama, tal como cáncer de mama.

B. *Ensayo de Unión Competitiva.* El ensayo de unión competitiva usa un péptido o proteína que genera una señal medible cuando el péptido marcado se pone en contacto con una micropartícula recubierta con anticuerpo anti-péptido. Este ensayo puede realizarse en el Analizador IMx<sup>®</sup> (disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El péptido marcado se añade a las micropartículas recubiertas con anticuerpo de BS322 (preparadas como se describe en el Ejemplo 17) en presencia de una muestra de ensayo sospechosa de contener antígeno BS322 y se incuban durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de péptido BS322 marcado (o proteína marcada)/anticuerpo unido  
65 y/o complejos de antígeno BS322 de paciente/anticuerpo unido. El antígeno BS322 en la muestra de ensayo compite con el péptido BS322 marcado (o proteína BS322) por los sitios de unión en la micropartícula. El antígeno BS322 en la muestra de ensayo da como resultado una unión disminuida de péptido marcado y micropartículas recubiertas con anticuerpo en el ensayo puesto que el antígeno en la muestra de ensayo y el péptido BS322 o proteína BS322 compiten

## ES 2 343 103 T3

por los sitios de unión al anticuerpo. Una señal disminuida (en comparación con un control) indica la presencia de antígeno BS322 en la muestra de ensayo. La presencia de antígeno BS322 sugiere el diagnóstico de una enfermedad o afección de la mama, tal como cáncer de mama.

5 Los polinucleótidos de BS322 y las proteínas codificadas por los mismos que se han proporcionado y analizado anteriormente en este documento son útiles como marcadores de enfermedad de tejido mamario, especialmente cáncer de mama. Los ensayos basados en la aparición de este marcador en una muestra de ensayo tal como sangre, plasma o suero pueden proporcionar información de diagnóstico no invasiva de bajo coste para ayudar al médico a realizar un diagnóstico de cáncer, para ayudar a seleccionar un protocolo de terapia o para controlar el éxito de una terapia  
10 seleccionada. Este marcador puede aparecer en fluidos corporales fácilmente accesibles tales como sangre, orina o heces como antígenos derivados del tejido enfermo que son detectables por métodos inmunológicos. Este marcador puede estar elevado en una patología, alterado en una patología o ser una proteína normal de la mama que aparece en un compartimento corporal inapropiado.

15 Ejemplo 20

### *Detección Inmunohistoquímica de Proteína BS322*

20 Se usa antisuero contra un péptido sintético BS322 o derivado de las secuencias peptídicas consenso (SECUENCIA ID N° 24 y SECUENCIA ID N° 25) descritas en el Ejemplo 14 anterior para teñir inmunohistoquímicamente una diversidad de tejidos normales y enfermos usando procedimientos convencionales. En resumen, los bloques de tejido congelados se cortan en secciones de 6 micrómetros y se colocan en portaobjetos de microscopio. Después de la fijación en acetona fría, las secciones se secan a temperatura ambiente, después se lavan con solución salina tamponada con fosfato y se bloquean. Los portaobjetos se incuban con el antisuero contra un péptido sintético derivado de las  
25 secuencias peptídicas consenso de BS322 (SECUENCIA ID N° 24 y SECUENCIA ID N° 25) a una dilución de 1:500, se lavan, se incuban con anticuerpo de cabra anti-conejo biotinilado, se lavan de nuevo y se incuban con avidina marcada con peroxidasa de rábano picante. Después de un lavado final, los portaobjetos se incuban con sustrato de 3-amino-9-etilcarbazol que proporciona una tinción roja. Los portaobjetos se contratiñen con hematoxilina, se montan y se examinan en un microscopio por un patólogo.

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 343 103 T3

## REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de cáncer de mama en un individuo, comprendiendo dicho método:

(a) poner en contacto una muestra de ensayo sospechosa de contener polinucleótido diana de dicho individuo con al menos un oligonucleótido que tenga una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tenga una identidad de al menos el 90% con un polinucleótido seleccionado del grupo que consisten en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y complementarias de las mismas, donde la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces;

(b) detectar la presencia de polinucleótidos diana de la muestra de ensayo que se unen a dicho oligonucleótido, cuya detección indica cáncer mama.

2. Un método para detectar cáncer de mama en un individuo, comprendiendo dicho método:

(a) realizar una transcripción inversa en una muestra de ensayo sospechosa de contener ARNm diana de dicho individuo usando al menos un cebador para producir ADNc, donde la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces;

(b) amplificar al ADNc obtenido de la etapa (a) usando oligonucleótidos como cebadores sentido y antisentido para obtener un amplicón; y

(c) detectar la presencia de dicho amplicón, cuya detección indica cáncer de mama, donde los oligonucleótidos cebadores utilizados en las etapas (a) y (b) tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y tienen una identidad de al menos el 90% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y complementarias de las mismas.

3. Un método de detección de cáncer de mama en un individuo, comprendiendo dicho método:

(a) poner en contacto una muestra de ensayo sospechosa de contener un polinucleótido diana de dicho individuo con al menos un oligonucleótido como cebador sentido y con al menos un oligonucleótido como cebador antisentido y amplificar para obtener un producto de reacción de primera fase, donde la muestra de ensayo se seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces;

(b) poner en contacto dicho producto de reacción de primera fase con al menos otro oligonucleótido para obtener un producto de reacción de segunda fase con la condición de que el otro oligonucleótido se localice 3' a los oligonucleótidos utilizados en la etapa (a) y sea complementario a dicho producto de reacción de primera fase; y

(c) detectar dicho producto de reacción de segunda fase como un indicio de la presencia del polinucleótido diana, cuya detección indica cáncer de mama, donde los oligonucleótidos utilizados en las etapas (a) y (b) tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y tienen una identidad de al menos el 90% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y complementarias de las mismas.

4. Un kit de ensayo útil para detectar un polinucleótido en una muestra de ensayo, cuya detección indica cáncer de mama, comprendiendo dicho kit de ensayo un recipiente que contiene al menos un polinucleótido que tiene una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tiene una identidad de al menos el 90% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y complementarias de las mismas.

5. Un polinucleótido purificado, en el que dicho polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en:

un polinucleótido que tiene una longitud desde 15 nucleótidos hasta el número de nucleótidos en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y complementarias de las mismas y que tiene una identidad de al menos el 90% con dicha secuencia complementaria de la misma.

6. Un sistema de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que incluye una fase de lectura abierta unida operativamente a una secuencia de control compatible con un huésped deseado, en el que dicha secuencia de ácido nucleico tiene una longitud desde 15 nucleótidos hasta el número de nucleótidos en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9 y complementarias de las mismas y tiene una identidad de al menos el 80% con dicha secuencia o complementaria de la misma.

## ES 2 343 103 T3

7. Un polipéptido que tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28.
- 5 8. Un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28.
- 10 9. Un kit de ensayo para determinar la presencia de un antígeno o anticuerpo en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho kit un recipiente que contiene un polipéptido que tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28.
- 15 10. Un kit de ensayo para determinar la presencia de un antígeno en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho kit un recipiente que contiene un anticuerpo de la reivindicación 8.
- 20 11. Un método para producir un polipéptido, comprendiendo dicho método incubar células huésped que se han transfectado con un vector de expresión que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido, en el que dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28.
- 25 12. Un método para detectar cáncer de mama en un individuo, comprendiendo dicho método:
- 30 (a) poner en contacto una muestra de ensayo sospechosa de contener antígeno diana de dicho individuo con una molécula de unión específica que se une a al menos a un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28, y fragmentos de las mismas que tienen al menos 15-20 aminoácidos, donde dicho contacto se realiza durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos de molécula de unión/antígeno, donde la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces; y
- 35 (b) detectar la presencia de dichos complejos como un indicio de la presencia de dicho antígeno diana, cuya detección indica cáncer de mama.
- 40 13. Un método para detectar cáncer de mama en un individuo, comprendiendo dicho método:
- 45 (a) poner en contacto una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos diana de dicho individuo con un polipéptido que contiene al menos un epítipo de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28 y donde además dicho contacto se realiza durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que se formen complejos de antígeno/anticuerpo, donde la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, fluidos linfáticos, secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva y heces; y
- 50 (b) detectar la presencia de dichos complejos como un indicio de la presencia de anticuerpos diana, cuya detección indica cáncer de mama.
- 55 14. Una célula transfectada con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un epítipo, donde dicha secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID N° 1-9, complementarias de las mismas y fragmentos de dichas secuencias que tienen al menos 15 nucleótidos.
- 60 15. Uso de un polipéptido inmunogénico aislado para fabricar una preparación para su administración a un individuo en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmune para producir anticuerpos para tratar el cáncer de mama, donde dicho polipéptido inmunogénico comprende al menos un epítipo y tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28.
- 65 16. Uso de un plásmido para fabricar una preparación para su administración a un individuo para producir anticuerpos para tratar el cáncer de mama, en el que dicho plásmido comprende una secuencia que codifica al menos un epítipo de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28, y fragmentos de las mismas que tienen al menos 15-20 aminoácidos.

## ES 2 343 103 T3

17. Uso de un polipéptido inmunogénico aislado para fabricar una preparación para su administración a un individuo en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmune para producir anticuerpos para el diagnóstico *in vivo* de cáncer de mama, después de la inyección de dichos anticuerpos en un paciente, en el que dicho polipéptido inmunogénico comprende al menos un epítipo y tiene al menos 15-20 aminoácidos y una identidad de al menos el 85% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27 y SECUENCIA ID N° 28.

18. Uso de un plásmido para fabricar una preparación para su administración a un individuo para producir anticuerpos para el diagnóstico *in vivo* de cáncer de mama, después de una inyección de dichos anticuerpos en un paciente, donde dicho plásmido comprende una secuencia que codifica al menos un epítipo de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la SECUENCIA ID N° 24, SECUENCIA ID N° 25, SECUENCIA ID N° 26, SECUENCIA ID N° 27, SECUENCIA ID N° 28 y fragmentos de las mismas que tienen al menos 15-20 aminoácidos.

19. Uso de un anticuerpo de la reivindicación 8 para la fabricación de una preparación para tratar el cáncer de mama por inyección de dicha preparación a un paciente sospechoso de tener cáncer de mama.

20. Uso de un anticuerpo de la reivindicación 8 para fabricar una preparación para el diagnóstico *in vivo* de cáncer de mama después de la inyección de dicha preparación en un paciente sospechoso de tener cáncer de mama.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1A

>4304443inh	AGTATACATT	CTTTATTAAT	CATTTTGCTT	CCAACCCCAT	TTAGCCTGCC
>4304443H1	GTATACATT	CTTTATTAAT	CATTTTGCTT	CCAACCCCAT	TTAGCCTGCC
Consenso	AGTATACATT	CTTTATTAAT	CATTTTGCTT	CCAACCCCAT	TTAGCCTGCC
>4304443inh	ATTGAAATGC	AAAAGTCTGT	TCCAAATAAA	GCCTTGGAAT	TGAAGAATGA
>4304443H1	ATTGAAATGC	AAAAGTCTGT	TCCAAATAAA	GCCTTGGAAT	TGAANAATGA
>3040232H1	GAAATGC	AAAAGTCTGT	TCCAAATAAA	GCCTTGGAAT	TGAAGAATGA
Consenso	ATTGAAATGC	AAAAGTCTGT	TCCAAATAAA	GCCTTGGAAT	TGAAGAATGA
>4304443inh	ACAAACATTG	AGAGCAGATG	AGATACTCCC	ATCAGAATCC	AAACAAAAGG
>4304443H1	ACAAACATTG	AGAGCAGATG	AGATACTCCC	ATCAGAATCC	AAACAAAAGG
>3040232H1	ACAAACATTG	AGAGCAGATG	AGATACTCCC	ATCAGAATCC	AAACAAAAGG
Consenso	ACAAACATTG	AGAGCAGATG	AGATACTCCC	ATCAGAATCC	AAACAAAAGG
>4304443inh	ACTATGAAGA	AAGTTCCTGG	GATTCTGAGA	GTCTCTGTGA	GACTGTTTCA
>4304443H1	ACTATGAAGA	AAGTTCCTGG	GATTCTGAGA	GTCTCTGTGA	GACTGTTTCA
>3040232H1	ACTATGAAGA	AAGTTCCTGG	GATTCTGAGA	GTCTCTGTGA	GACTGTTTCA
Consenso	ACTATGAAGA	AAGTTCCTGG	GATTCTGAGA	GTCTCTGTGA	GACTGTTTCA
>4304443inh	CAGAAGGATG	TGTGTTTACC	CAAGGCTGCG	CATCAAAAAG	AAATAGATAA
>4304443H1	CAGAAGGATG	TGTGTTTACC	CAAGGCTGCG	CATCAAAAAG	AAATAGATAA
>3040232H1	CAGAAGGATG	TGTGTTTACC	CAAGGCTGCG	CATCAAAAAG	AAATAGATAA
Consenso	CAGAAGGATG	TGTGTTTACC	CAAGGCTGCG	CATCAAAAAG	AAATAGATAA
>4304443inh	AATAAATGGA	AAATTAGAAG	GGTCTCCTGT	TAAAGATGGT	CTTCTGAAGG
>4304443H1	AATAA				
>3040232H1	AATAAATGGA	AAATTAGAAG	GGTCTCCTGT	TAAAGATGGT	CTTCTGAAGG
Consenso	AATAAATGGA	AAATTAGAAG	GGTCTCCTGT	TAAAGATGGT	CTTCTGAAGG
>4304443inh	CTAACTGCGG	AATGAAAGTT	TCTATTCCAA	CTAAAGCCTT	AGAATTGATG
>3040232H1	CTAACTGCGG	AATGAAAGTT	TCTATTCCAA	C	
Consenso	CTAACTGCGG	AATGAAAGTT	TCTATTCCAA	CTAAAGCCTT	AGAATTGATG
>4304443inh	GACATGCAAA	CTTTCAAAGC	AGAGCCTCCC	GAGAAGCCAT	CTGCCTTCGA
Consenso	GACATGCAAA	CTTTCAAAGC	AGAGCCTCCC	GAGAAGCCAT	CTGCCTTCGA
>4304443inh	GCCTGCCATT	GAAATGCAAA	AGTCTGTTC	AAATAAAGCC	TTGGAATTGA
Consenso	GCCTGCCATT	GAAATGCAAA	AGTCTGTTC	AAATAAAGCC	TTGGAATTGA
>4304443inh	AGAATGAACA	AACATTGAGA	GCAGATGAGA	TACTCCCATC	AGAATCCAAA
Consenso	AGAATGAACA	AACATTGAGA	GCAGATGAGA	TACTCCCATC	AGAATCCAAA
>4304443inh	CAAAAGGACT	ATGAAGAAAG	TTCTTGGGAT	TCTGAGAGTC	TCTGTGAGAC
Consenso	CAAAAGGACT	ATGAAGAAAG	TTCTTGGGAT	TCTGAGAGTC	TCTGTGAGAC
>4304443inh	TGTTTCACAG	AAGGATGTGT	GTTTACCCAA	GGCTACACAT	CAAAAAGAAA
Consenso	TGTTTCACAG	AAGGATGTGT	GTTTACCCAA	GGCTACACAT	CAAAAAGAAA
>4304443inh	TAGATAAAAT	AAATGGAAAA	TTAGAAGAGT	CTCCTGATAA	TGATGGTTTT
Consenso	TAGATAAAAT	AAATGGAAAA	TTAGAAGAGT	CTCCTGATAA	TGATGGTTTT

ES 2 343 103 T3

Figura 1B

>4304443inh Consenso	CTGAAGGCTC	CCTGCAGAAT	GAAAGTTTCT	ATTCCAAC TA	AAGCCTTAGA
	CTGAAGGCTC	CCTGCAGAAT	GAAAGTTTCT	ATTCCAAC TA	AAGCCTTAGA
>4304443inh Consenso	ATTGATGGAC	ATGCAAAC TT	TCAAAGCAGA	GCCTCCCGAG	AAGCCATCTG
	ATTGATGGAC	ATGCAAAC TT	TCAAAGCAGA	GCCTCCCGAG	AAGCCATCTG
>4304443inh Consenso	CCTTCGAGCC	TGCCATGAA	ATGCAAAAGT	CTGTTCCAAA	TAAAGCCTTG
	CCTTCGAGCC	TGCCATGAA	ATGCAAAAGT	CTGTTCCAAA	TAAAGCCTTG
>4304443inh <3790941H1 >3424294H1 Consenso	GAATTGAAGA	ATGAACAAAC	ATTGAGAGCA	GATCAGATGT	TCCCTTCAGA TCCCTTCAGA CAGA
	GAATTGAAGA	ATGAACAAAC	ATTGAGAGCA	GATCAGATGT	TCCCTTCAGA
>4304443inh <3790941H1 >3424294H1 Consenso	ATCAAAACAA	AAGAAGCTTG	AAGAAAATTC	TTGGGATTCT	GAGAGTCTCC
	ATCAAAACNA	AAGAAGGTTG	:AAGAAAATTC	TTGGGATTCT	GAGAGTCTCC
	ATCAAAACAA	AAGAAGGTTG	AAGAAAATTC	TTGGGATTCT	GAGAGTCTCC
	ATCAAAACAA	AAGAAGGTTG	AAGAAAATTC	TTGGGATTCT	GAGAGTCTCC
>4304443inh <3790941H1 >3424294H1 Consenso	GTGAGACTGT	TTCACAGAAG	GATGTGTGTG	TACCCAAGGC	TACACATCAA
	GTGAGACTGT	TTCACAG:AG	GATGTGTGTG	TACCCAAGGC	TACACATCAA
	GTGAGACTGT	TTCACAGAAG	GATGTGTGTG	TACCCAAGGC	TACACATCAA
	GTGAGACTGT	TTCACAGAAG	GATGTGTGTG	TACCCAAGGC	TACACATCAA
>4304443inh <3790941H1 >3424294H1 Consenso	AAAGAAATGG	ATAAAATAAG	TGGAAAATTA	GAAGATTCAA	CTAGCCTATC
	AAAGAAATGG	ATAAAATAAG	TGGAAAATTA	GAAGATTCAA	CTAGCCTATC
	AAAGAAATGG	ATAAAATAAG	TGGAAAATTA	GAAGATTCAA	CTAGCCTATC
	AAAGAAATGG	ATAAAATAAG	TGGAAAATTA	GAAGATTCAA	CTAGCCTATC
>4304443inh <3790941H1 >3424294H1 Consenso	AAAAATCTTG	GATACAA TTC	ATTCTTGTGA	AAGAGCAAGG	GAACTTCAA A
	AAAAATCTTG	GATACACTTC	ATTCTTGTGA	AAGAGCAAGG	GAACTTCAA A
	AAAAATCTTG	GATACAGTTC	ATTCTTGTGA	AAGAGCAAGG	GAACTTCAA A
	AAAAATCTTG	GATACAGTTC	ATTCTTGTGA	AAGAGCAAGG	GAACTTCAA A
>4304443inh <3790941H1 >3424294H1 Consenso	AAGATCACTG	TGAACAATGT	ACAGGAAAAA	TGGAACAAAT	GAAAAAGAAG
	AAGATCACTG	TGAACAACGT	ACAGGAAAAA	TGGAACAAAT	GAAAAAGAAG
	AAGATCACTG	TGAACAACGT	ACAGGAAAAA	TGGAACAAAT	GAN A
	AAGATCACTG	TGAACAACGT	ACAGGAAAAA	TGGAACAAAT	GAAAAAGAAG
>4304443inh <3790941H1 Consenso	TTTTGTGTAC	TGAAAAAGAA	ACTGTCAGAA	GCAAAAAGAA	TAAAATCACA
	TTTTGTGTAC	TGAAAAAGAA	ACTGTCAGAA	GCAAAA	
	TTTTGTGTAC	TGAAAAAGAA	ACTGTCAGAA	GCAAAAAGAA	TAAAATCACA
>4304443inh >2741038H1 Consenso	GTTAGAGAAC	CAAAAAGTTA	AATGGGAACA	AGAGCTCTGC	AGTGTGAGGT
	GTTAGAGAAC	CAAAAAGTTA	AATGGGAACA	GNGCTCTGC	NGTGTGAGGN
	GTTAGAGAAC	CAAAAAGTTA	AATGGGAACA	AGAGCTCTGC	AGTGTGAGGT

# ES 2 343 103 T3

Figura 1C

```

>4304443inh TTCTCACACT CATGAAATG AAAATTATCT CTTACATGAA AATTGCATGT
>2741038H1 TTCTCACACT CATGANAATN AAAATNATCT CTTACATGAN AATTGCATGT
Consenso TTCTCACACT CATGAAATG AAAATTATCT CTTACATGAA AATTGCATGT

>4304443inh TGAAAAAGGA AATTGCCATG CTAAACTGG AAATAGCCAC ACTGAAACAC
>2741038H1 TGAAAAAGGA AATTGCCATG CTAAACTGG AAATAGCCAC ACTGAAACAC
Consenso TGAAAAAGGA AATTGCCATG CTAAACTGG AAATAGCCAC ACTGAAACAC

>4304443inh CAATACCAGG AAAAGGAAAA TAAATACTTT GAGGACATTA AGATTTTAAA
>2741038H1 CAATACCAGG AAAAGGAAAA TAAATACTTT GAGGACATTA AGATTTTAAA
Consenso CAATACCAGG AAAAGGAAAA TAAATACTTT GAGGACATTA AGATTTTAAA

>4304443inh AGAAAAGAAT GCTGAACTTC AGATGACCCT AAAACTGAAA GAGGAATCAT
>2741038H1 AGANAAGAAT GCTGAACTTC AGATGACCCT AAAACTGAAA GAGGAATCAT
Consenso AGAAAAGAAT GCTGAACTTC AGATGACCCT AAAACTGAAA GAGGAATCAT

>4304443inh TAACTAAAAG GGCATCTCAA TATAGTGGGC AGCTTAAAGT TCTGATAGCT
>2741038H1 TAACTAAAAG GGCATCTCAA TATAGTGGGC AGCTT
Consensus TAACTAAAAG GGCATCTCAA TATAGTGGGC AGCTTAAAGT TCTGATAGCT

>4304443inh GAGAACACAA TGCTCACTTC TAAATTGAAG GAAAAACAAG ACAAAGAAAT
Consenso GAGAACACAA TGCTCACTTC TAAATTGAAG GAAAAACAAG ACAAAGAAAT

>4304443inh ACTAGAGGCA GAAATTGAAT CACACCATCC TAGACTGGCT TCTGCTGTAC
Consenso ACTAGAGGCA GAAATTGAAT CACACCATCC TAGACTGGCT TCTGCTGTAC

>4304443inh AAGACCATGA TCAAATTGTG ACATCAAGAA AAAGTCAAGA ACCTGCTTTC
>4302934H1 TCAAGAA AAAGTCAAGA ACCTGCTTTC
Consenso AAGACCATGA TCAAATTGTG ACWTCAAGAA AAAGTCAAGA ACCTGCTTTC

>4304443inh CACATTGCAG GAGATGCTTG TTTGCAAAGA AAAATGAATG TTGATGTGAG
>4302934H1 CACATTGCAG GAGATGCTTG TTTGCAAAGA AAAATGAATG TTGATGTGAG
Consensus CACATTGCAG GAGATGCTTG TTTGCAAAGA AAAATGAATG TTGATGTGAG

>4304443inh TAGTACGATA TATAACAATG AGGTGCTCCA TCAACCACTT TCTGAAGCTC
>4302934H1 TAGTACGATA TATAACAATG AGGTGCTCCA TCAACCACTT TCTGAAGCTC
Consenso TAGTACGATA TATAACAATG AGGTGCTCCA TCAACCACTT TCTGAAGCTC

>4304443inh AAAGGAAATC CAAAAGCCTA AAAATTAATC TCAATTATGC AGGAGATGCT
>4302934H1 AAAGGAAATC CAAAAGCCTA AAAATTAATC TCAATTATGC CGGAGATGCT
Consenso AAAGGAAATC CAAAAGCCTA AAAATTAATC TCAATTATGC MGGAGATGCT

>4304443inh CTAAGAGAAA ATACATTGGT TTCAGAACAT GCACAAAGAG ACCAACGTGA
>4302934H1 CTAAGAGAAA ATACATTGGT TTCAGAACAT GCACAAAGAG ACCAACGTGA
Consenso CTAAGAGAAA ATACATTGGT TTCAGAACAT GCACAAAGAG ACCAACGTGA

>4304443inh AACACAGTGT CAAATGAAGG AAGCTGAACA CATGTATCAA AACGAACAAG
>4302934H1 AACACAGTGT CAAATGAAGG AAGCTGAACA CATGTATC AACGAACAAG
Consenso AACACAGTGT CAAATGAAGG AAGCTGAACA CATGTATCAA AACGAACAAG

```

ES 2 343 103 T3

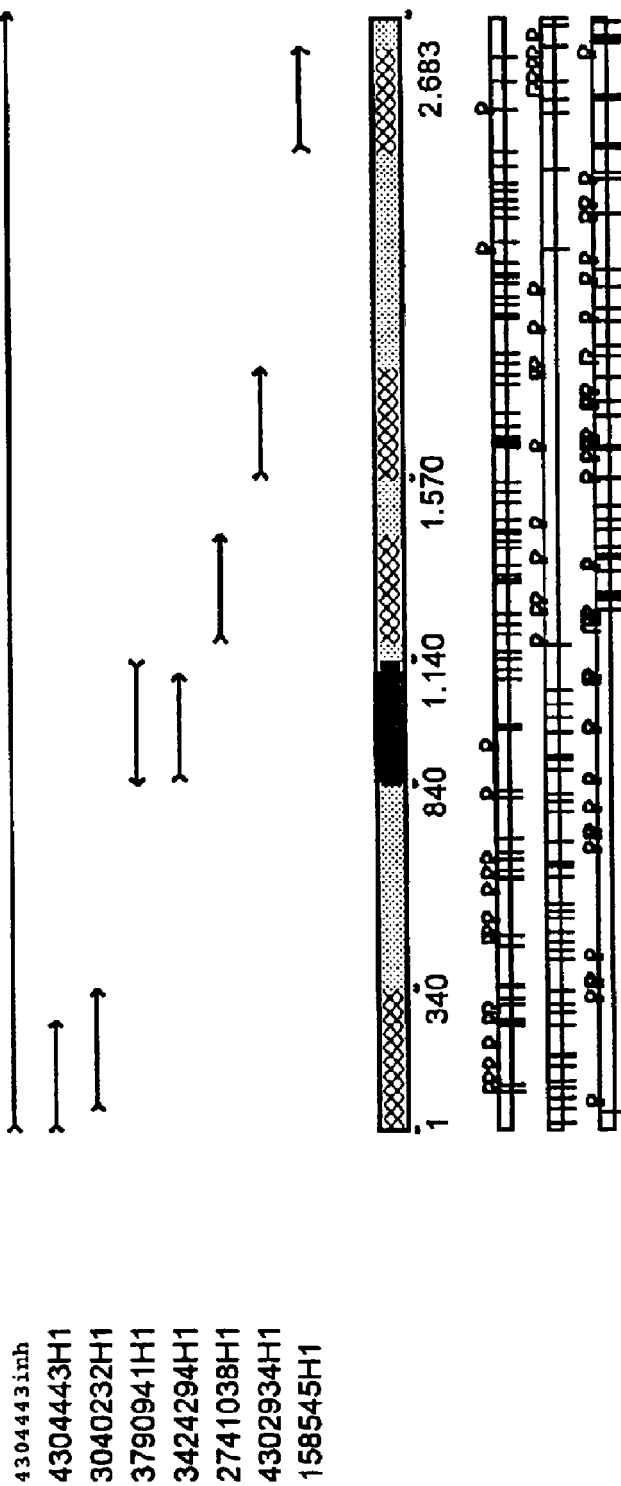
Figura 1D

>4304443inh Consenso	ATAATGTGAA CAAACACACT GAACAGCAGG AGTCTCTAGA TCAGAAATTA ATAATGTGAA CAAACACACT GAACAGCAGG AGTCTCTAGA TCAGAAATTA
>4304443inh Consenso	TTTCAACTAC AAAGCAAAAA TATGTGGCTT CAACAGCAAT TAGTTCATGC TTTCAACTAC AAAGCAAAAA TATGTGGCTT CAACAGCAAT TAGTTCATGC
>4304443inh Consenso	ACATAAGAAA GCTGACAACA AAAGCAAGAT AACAAATTGAT ATTCATTTTC ACATAAGAAA GCTGACAACA AAAGCAAGAT AACAAATTGAT ATTCATTTTC
>4304443inh Consenso	TTGAGAGGAA AATGCAACAT CATCTCCTAA AAGAGAAAAA TGAGGAGATA TTGAGAGGAA AATGCAACAT CATCTCCTAA AAGAGAAAAA TGAGGAGATA
>4304443inh Consenso	TTTAATTACA ATAACCATTT AAAAAACCGT ATATATCAAT ATGAAAAAGA TTTAATTACA ATAACCATTT AAAAAACCGT ATATATCAAT ATGAAAAAGA
>4304443inh Consenso	GAAAGCAGAA ACAGAAAAC TATGAGAGAC AAGCAGTAAG AAACCTCTTT GAAAGCAGAA ACAGAAAAC TATGAGAGAC AAGCAGTAAG AAACCTCTTT
>4304443inh Consenso	TGGAGAAACA ACAGACCAGA TCTTTACTCA CAACTCATGC TAGGAGGCCA TGGAGAAACA ACAGACCAGA TCTTTACTCA CAACTCATGC TAGGAGGCCA
>4304443inh Consenso	GTCCTAGCAT CACCTTATGT TGAAAATCTT ACCAATAGTC TGTGTCAACA GTCCTAGCAT CACCTTATGT TGAAAATCTT ACCAATAGTC TGTGTCAACA
>4304443inh Consenso	GAATACTTAT TTTAGAAGAA AATTCATGA TTTCTTCCTG AAGCCTACAG GAATACTTAT TTTAGAAGAA AATTCATGA TTTCTTCCTG AAGCCTACAG
>4304443inh Consenso	ACATAAAATA ACAGTGTGAA GAATTAATTG TTCACGAATC TCGCTCTGCA ACATAAAATA ACAGTGTGAA GAATTAATTG TTCACGAATC TCGCTCTGCA
>4304443inh >158545H1 Consenso	CTCCAGCCTA GCGCCCTAGT GAAACCCTGT GTCAAAAAGA AAAAAACAAA CCTA GCGCCCTAGT GAAACCCTGT GTCAAAAAGA AAAAAACAAA CTCCAGCCTA GCGCCCTAGT GAAACCCTGT GTCAAAAAGA AAAAAACAAA
>4304443inh >158545H1 Consenso	AACAAACTTC CAAGACCTCG AGTGGTTTTT GGAGACCCTG TATCACTTCA ANCAAACTTC CAAGACCTCG AGTGGTTTTN GGAGACCCTG TATCACTTCA AACAAACTTC CAAGACCTCG AGTGGTTTTT GGAGACCCTG TATCACTTCA
>4304443inh >158545H1 Consenso	AATAATGTGT TAAACAAGCA TCTTCATCTC ATTAAATAGA AATGTTGAAA AATAATGTGT TAAACAAGCA TCTTCATCTC ATTAAATAGA AATGTTGAAA AATAATGTGT TAAACAAGCA TCTTCATCTC ATTAAATAGA AATGTTGAAA
>4304443inh >158545H1 Consenso	AATTGCTTTT GGAATAATTG ACTTATGGAT ATTCATCAA ATTTACAGTT AATTGCTTTT GGAATAATTG ACTTATGGAT ATTCATCAA ATTTACAGTT AATTGCTTTT GGAATAATTG ACTTATGGAT ATTCATCAA ATTTACAGTT
>4304443inh >158545H1 Consenso	GGCTATGCTT TCTTATGTG CATACTATGA AATGTTTTTC TTCAAAAGT GGCTATGCTT TCTTATGTG CATACTATGA AATGTTTTNN TTCATT GGCTATGCTT TCTTATGTG CATACTATGA AATGTTTTTC TTCAWAAGT

Figura 1E

```
>4304443inh      GTTTATAAGT GGTAAGTTTA AGAATGGGGT TGACAGCATT ATCTTTTGTG  
Consenso         GTTTATAAGT GGTAAGTTTA AGAATGGGGT TGACAGCATT ATCTTTTGTG  
  
>4304443inh      GTTATTGAT  TAAACATTTA  CTAATTGTGC  ATA  
Consenso       GTTATTGAT  TAAACATTTA  CTAATTGTGC  ATA
```

Figura 2



# ES 2 343 103 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Abbott Laboratories
- 5 <120> Reactivos y Métodos Útiles para Detectar Enfermedades de la Mama
- <130> 6451.PC.01
- 10 <160> 30
- <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- 15 <210> 1  
<211> 254  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- 20 <220>  
<221> base\_polimorfismo
- 25 <222> 94  
<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición
- <400> 1
- 30 **gtatacattc tttattaatc attttgcttc caaccaccatt tagcctgcc a ttgaaatgca 60**  
**aaagtctggt ccaaataaag ccttggaatt gaanaatgaa caaacattga gagcagatga 120**  
**gatactccca tcagaatcca aacaaaagga ctatgaagaa agttcttggg attctgagag 180**  
**tctctgtgag actgtttcac agaaggatgt gtgtttacc aaggctgccc atcaaaaaga 240**  
35 **aatagataaa ataa 254**
- <210> 2  
<211> 278  
40 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- <400> 2
- 45 **gaaatgcaaa agtctgttcc aaataaagcc ttggaattga agaatgaaca aacattgaga 60**  
**gcagatgaga tactcccatc agaatccaaa caaaaggact atgaagaaag ttcttgggat 120**  
**tctgagagtc tctgtgagac tgtttcacag aaggatgtgt gtttacc aa ggctgcgcat 180**  
**caaaaagaaa tagataaaat aaatggaaaa ttagaagggt ctctgttaa agatgggtctt 240**  
50 **ctgaaggcta actgcggaat gaaagtttct attccaac 278**
- <210> 3  
<211> 294  
55 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- <220>  
60 <221> base\_polimorfismo  
<222> 276  
<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición
- 65

## ES 2 343 103 T3

<400> 3

```

5      ttttgcttct gacagtttct ttttcagtac acaaaacttc tttttcattt gttccatttt      60
      tcctgtacgt tgttcacagt gatctttttg aagttccctt gctctttcac aagaatgaac      120
      tgtatccaag atttttgata ggctagttga atcttctaata tttccactta ttttatccat      180
      ttctttttga tgtgtagcct tgggtacaca cacatcctct gtgaaacagt ctcacggaga      240
      ctctcagaat cccaagaatt ttctcaacct tctttngttt tgattctgaa gggga      294

```

10

<210> 4

<211> 248

<212> ADN

15

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> base\_polimorfismo

20

<222> 247

<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

25

<400> 4

```

      cagaatcaaa acaaaagaag gttgaagaaa attcttggga ttctgagagt ctccgtgaga      60
      ctgtttcaca gaaggatgtg tgtgtaccca aggctacaca tcaaaaagaa atggataaaa      120
      taagtggaaa attagaagat tcaactagcc tatcaaaaat ctggataca gttcattctt      180
      gtgaaagagc aagggaaactt caaaaagatc actgtgaana acgtacagga aaaatggaac      240
      aaatgana                                     .                                     248

```

35

<210> 5

<211> 254

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40

<220>

<221> base\_polimorfismo

<222> 2

45

<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

<220>

<221> base\_polimorfismo

50

<222> 10

<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

<220>

55

<221> base\_polimorfismo

<222> 19

<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

60

<220>

<221> base\_polimorfismo

<222> 35

65

<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

## ES 2 343 103 T3

<220>  
 <221> base\_polimorfismo  
 <222> 39  
 5 <223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición  
  
 <220>  
 <221> base\_polimorfismo  
 10 <222> 45  
 <223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición  
  
 <220>  
 15 <221> base\_polimorfismo  
 <222> 59  
 <223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición  
  
 20 <220>  
 <221> base\_polimorfismo  
 <222> 173  
 25 <223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición  
  
 <400> 5  
  
 30 **gngctctgcn gtgtgaggnt tctcacactc atganaatna aatnatctc ttacatgana 60**  
**attgcatggt gaaaaaggaa attgccatgc taaaactgga aatagccaca ctgaaacacc 120**  
**aataccagga aaaggaaaat aaatactttg aggacattaa gattttaaaa ganaagaatg 180**  
**ctgaacttca gatgacccta aaactgaaag aggaatcatt aactaaaagg gcatctcaat 240**  
**atagtgggca gctt 254**  
 35  
  
 <210> 6  
 <211> 267  
 40 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 45 <221> base\_polimorfismo  
 <222> 45  
 <223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición  
  
 50 <220>  
 <221> base\_polimorfismo  
 <222> 51  
 55 <223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición  
  
 <400> 6  
  
 60 **ttcaagaaaa agtcaagaac ctgctttcca cattgcagga gatgncttgt ntgcaaagaa 60**  
**aatgaatgt tgatgtgagt agtacgatat ataacaatga ggtgctccat caaccacttt 120**  
**ctgaagctca aaggaaatcc aaaagcctaa aaattaatct caattatgcc ggagatgctc 180**  
**taagagaaaa tacattgggt tcagaacatg cacaaagaga ccaacgtgaa acacagtgtc 240**  
**aatgaagga agctgaacac atgtatc 267**  
 65

## ES 2 343 103 T3

<210> 7  
<211> 240  
<212> ADN  
5 <213> *Homo sapiens* 3

<220>  
<221> base\_polimorfismo  
10 <222> 46  
<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

<220>  
15 <221> base\_polimorfismo  
<222> 74  
<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

20 <220>  
<221> base\_polimorfismo  
<222> 233  
25 <223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

<220>  
<221> base\_polimorfismo  
30 <222> 234  
<223> /nota = "n" representa un polimorfismo de a o g o t o c en esta posición

<400> 7  
35

```

      cctagggcgc tagtgaaacc ctgtgtcaaa aagaaaaaaaa caaaancaaa cttccaagac      60
      ctcgagtggg tttngggagac cctgtatcac ttcaaataat gtgttaaaca agcatcttca      120
      tctcattaaa tagaaatggt gaaaaattgc ttttgggaata attgacttat ggatatttca      180
      tcaaatttac agttggctat gctttcttat tgtgcatact atgaaatggt ttnnttcatt      240

```

<210> 8  
45 <211> 2683  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 343 103 T3

<400> 8

	agtatacatt	ctttattaat	catttttgctt	ccaaccccat	ttagcctgcc	attgaaatgc	60
5	aaaagtctgt	tccaaataaa	gccttggaa	tgaagaatga	acaaacattg	agagcagatg	120
	agatactccc	atcagaatcc	aaacaaaagg	actatgaaga	aagttccttg	gattctgaga	180
	gtctctgtga	gactgtttca	cagaaggatg	tgtgtttacc	caaggctgcg	catcaaaaag	240
	aaatagataa	aataaatgga	aaattagaag	ggctctctgt	taaagatggg	cttctgaagg	300
	ctaactgctg	aatgaaagtt	tctattccaa	ctaaagcctt	agaattgatg	gacatgcaaa	360
10	ctttc3aaagc	agagcctccc	gagaagccat	ctgccttcga	gcctgccatt	gaaatgcaaa	420
	agtctgttcc	aaataaagcc	ttggaattga	agaatgaaca	aacattgaga	gcagatgaga	480
	tactcccatc	agaatccaaa	caaaaggact	atgaagaaag	ttcttgggat	tctgagagtc	540
	tctgtgagac	tgtttcacag	aaggatgtgt	gtttacc3caa	ggctacacat	caaaaagaaa	600
	tagataaaaat	aaatggaaaa	ttagaagagt	ctcctgataa	tgatggtttt	ctgaaggctc	660
	cctgcagaat	gaaagtttct	attccaacta	aagccttaga	attgatggac	atgcaaaactt	720
15	tcaaagcaga	gcctccc3gag	aagccatctg	ccttc3gagcc	tgccattgaa	atgcaaaaagt	780
	ctgttccc3aaa	taaagccttg	gaattgaaga	atgaaccaaac	attgagagca	gagcagatgt	840
	tcccttcaga	atcaaaa3caa	aagaacgttg	aagaaaattc	ttgggattct	gagagctctc	900
	gtgagactgt	ttcacagaag	gatgtgtgtg	tacc3caaggc	tacacatcaa	aaagaaatgg	960
20	ataaaaat3aag	tggaaaatta	gaagattcaa	ctagcctatc	aaaaatcttg	gatacaattc	1020
	attctt3gtga	aagagcaagg	gaacttcaa	aagatcactg	tgaa3caatgt	acaggaaaaa	1080
	tggaa3caaat	gaaaaagaag	ttttgtgtac	tgaaaaagaa	actgtcagaa	gcaaaagaaa	1140
	taaaatcaca	gttagagaac	caaaaagtta	aatgggaaca	agagctctgc	agtgtgaggt	1200
	ttctcacact	catgaaaatg	aaaattatct	cttacctgaa	aattgcatgt	tgaaaaagga	1260
	aattg3ccatg	ctaaaactgg	aaatagccac	actgaa3cac	caataccagg	aaaaggaaaa	1320
25	taaaact3ttt	gaggacatta	agattt3taa	agaaaagaat	gctgaacttc	agatgacctt	1380
30	aaaactgaaa	gaggaatcat	taactaaaag	ggcatctcaa	tatagtgggc	agcttaaagt	1440
	tctgatagct	gagaacacaa	tgctcacttc	taaattgaag	gaaaaacaag	acaaagaaat	1500
	actagaggca	gaaat3gaa	cacaccatcc	tagactggct	tctgctgtac	aagaccatga	1560
	tcaaatt3gtg	acatcaagaa	aaagtcaaga	acctgcttcc	cacattgcag	gagatgcttg	1620
	tttgcaa3aga	aaaatgaatg	ttgatgtgag	tagta3gata	tataacaatg	agg7gctcca	1680
	tcaaccactt	tctgaagctc	aaaggaaatc	caaaagccta	aaaattaatc	tcaattatgc	1740
35	aggagat3gct	ctaagagaaa	atacattggg	ttcagaacat	gcacaaagag	accaacgtga	1800
	aacacag3tgt	caaatgaagg	aagctgaaca	catgtatcaa	aacgaacaag	ataatgtgaa	1860
	caaacacact	gaacagcagg	agtctctaga	tcagaaatta	tttcaactac	aaagcaaaaa	1920
	tatgtggctt	caacagcaat	tagttcatgc	acataagaaa	gctgacaaca	aaagcaagat	1980
	aacaatt3gat	attcat3ttt	ttgagaggaa	aatgcaacat	catctcctaa	aagagaaaaa	2040
40	tgaggagata	tttaattaca	ataaccattt	aaaaaac3cgt	atatatcaat	atgaaaaaga	2100
	gaaagcagaa	acagaaaact	catgagagac	aagcagtaag	aaacttcttt	tggagaaaca	2160
	acagaccaga	tctttactca	caactcatgc	taggaggcca	gtcctagcat	caccttatgt	2220
	tgaaaat3ctt	accaatagtc	tgtgtcaaca	gaatacttat	tttagaagaa	aaattcatga	2280
	tttctt3ctg	aagcotacag	acataaaaata	acagtgtgaa	gaattacttg	ttcacgaatc	2340
45	tcgctctgca	ctccagccta	ggcgccatgt	gaaacctgt	gtcaaaaaga	aaaaaac3aaa	2400
	aacaaacttc	caagacctcg	agtqgttttt	ggagacccctg	tatcacttca	aataatgtgt	2460
	taaacaagca	tcttcatctc	attaaataga	aatgttgaaa	aattgctttt	ggaataattg	2520
	acttatggat	atttcatcaa	attt3cagtt	ggctatgctt	tcttattgtg	catactatga	2580
	aatgtttttc	ttcaaaaagt	gtttataagt	ggtaagt3tta	agaatggggg	tgacagcatt	2640
50	atctttt3gtg	gttattttgat	taaacattta	ctaattgtgc	ata		2683

<210> 9

<211> 2683

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

60

65

# ES 2 343 103 T3

<400> 9

	agtatacatt	ctttattaat	cattttgctt	ccaaccccat	ttagcctgcc	attgaaatgc	60
5	aaaagtctgt	tccaaataaa	gccttggaat	tgaagaatga	acaaacattg	agagcagatg	120
	agatactccc	atcagaatcc	aaacaaaagg	actatgaaga	aagttcttgg	gattctgaga	180
	gtctctgtga	gactgtttca	cagaaggatg	tgtgtttacc	caaggctgcg	catcaaaaag	240
	aaatagataa	aataaatgga	aaattagaag	ggctcctctg	taaagatggt	cttctgaagg	300
	ctaactgogg	aatgaaagtt	tctattccaa	ctaaagcctt	agaattgatg	gacatgcaaa	360
10	ctttcaaagc	agagcctccc	gagaagccat	ctgccttcca	gcctgccatt	gaaatgcaaa	420
	agtcgtttcc	aaataaagcc	ttggaattga	agaatgaaac	aacattgaga	gcagatgaga	480
	tactcccatc	agaatccaaa	caaaaggact	atgaagaaag	ttcttgggat	tctgagagtc	540
	tctgtgagac	tgtttcacag	aaggatgtgt	gtttacccaa	ggctacacat	caaaaagaaa	600
	tagataaaa	aaatggaaaa	ttagaagagt	ctcctgataa	tgatggtttt	ctgaaggctc	660
15	cctgcagaat	gaaagtctct	attccaacta	aagccttaga	attgatggac	atgcaaaactt	720
	tcaaaqcaga	qcctcccqag	aaqccatctg	ccttcgagcc	tgccattgaa	atgcaaaagt	780
	ctgttccaaa	taaagccttg	gaattgaaga	atgaacaaac	attgagagca	gatcagatgt	840
	tcccttcaga	atcaaaacaa	aagaacgttg	aagaaaattc	ttgggattct	gagagtctcc	900
	gtgagactgt	ttcacagaag	gatgtgtgtg	taccaaggc	tacacatcaa	aaagaaatgg	960
20	ataaaataag	tggaaaatta	gaagattcaa	ctagcctatc	aaaaatcttg	gatacaattc	1020
	attcttgtga	aagagcaagg	gaacttcaaa	aagatcactg	tgaacaatgt	acaggaaaaa	1080
	tggaacaaat	gaaaaagaag	ttttgtgtac	tgaaaaagaa	actgtcagaa	gcaaaaagaaa	1140
	taaaatcaca	gttagagaac	caaaaagtta	aatgggaaca	agagctctgc	agtgtgaggt	1200
	ttctcacact	catgaaaatg	aaaattatct	cttacctgaa	aattgcatgt	tgaaaaagga	1260
25	aattgccatg	ctaaaactgg	aaatagccac	actgaaacac	caataaccagg	aaaaggaaaa	1320
	taaatacttt	gaggacatta	agatttttaa	agaaaagaat	gctgaacttc	agatgaccct	1380
	aaaactgaaa	gaggaaatcat	taactaaaag	ggcatctcaa	tatagtgggc	agcttaaagt	1440
	tctgatagct	gagaacacaa	tgctcacttc	taaattgaa	gaaaaacaag	acaaagaaat	1500
	actagaggca	gaaattgaat	cacaccatcc	tagactggct	tctgctgtac	aagaccatga	1560
30	tcaaatgtg	acatcaagaa	aaagtcaaga	acctgcttcc	cacattgcag	gagatgcttg	1620
	tttgcaagaa	aaaaatgaatg	ttgatgtgag	tagtacgata	tataacaatg	aggtgctcca	1680
	tcaaccactt	tctgaagctc	aaaggaaatc	caaaagccta	aaaattaatc	tcaattatgc	1740
	aggagatgct	ctaagagaaa	atacattggt	ttcagaacat	gcacaaagag	accaacgtga	1800
35							
	aacacagtgt	caaatgaagg	aagctgaaca	catgtatcaa	aacgaacaag	ataatgtgaa	1860
	caaacacact	gaacagcagg	agtctctaga	tcagaaatta	tttcaactac	aaagcaaaaa	1920
40	tatgtggcct	caacagcaat	tagttcatgc	acataagaaa	gctgacaaca	aaagcaagat	1980
	aacaattgat	attcattttc	ttgagaggaa	aatgcaacat	catctcctaa	aagagaaaaa	2040
	tgaggagata	tttaattaca	ataaccattt	aaaaaacctg	atatatcaat	atgaaaaaga	2100
	gaaagcagaa	acagaaaaac	catgagagac	aagcagtaag	aaacttcttt	tgagaaaaaca	2160
	acagaccaga	tctttactca	caactcatgc	taggaggcca	gtcctagcat	caccttatgt	2220
	tgaaaatcct	accaatagtc	tgtgtcaaca	gaatacttat	tttgaagaa	aaattcatga	2280
45	tttcttctctg	aagcctacag	acataaaaata	acagtgtgaa	gaattacttg	ttcacgaaac	2340
	tgcctctgca	ctccagccta	qqcgcctagt	qaaaccctgt	gtcaaaaaaga	aaaaaacaaa	2400
	aacaaaacttc	caagacctcg	agtggttttt	ggagaccctg	tatcacttca	aataatgtgt	2460
	taacaagca	tcttcatctc	attaataga	aatgttgaaa	aattgctttt	ggaataattg	2520
	ecttatggat	atttcatcaa	atttaccagt	ggctatgctt	tcttattgtg	catactatga	2580
50	aatgtttttc	ttcaaaaag	gtttataagt	ggtaagttta	agaatggggg	tgacagcatt	2640
	atcttttctg	gttatttgat	taaacattta	ctaattgtgc	ata		2683

<210> 10

55 <211> 68

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Sitio de restricción

65

# ES 2 343 103 T3

<400> 10  
                   **agctcgggaat tccgagcttg gatcctctag agcggccgcc gactagtgag ctcgtcgacc**          60  
                   **cggaatt**  68  
 5  
     <210> 11  
     <211> 68  
 10   <212> ADN  
     <213> Secuencia Artificial  
     <220>  
 15   <223> Sitio de restricción  
     <400> 11  
                   **aattaattcc cgggtcgcgc agctcactag tcggcggccg ctctagagga tccaagctcg**          60  
 20                   **gaattccg**  68  
     <210> 12  
 25   <211> 24  
     <212> ADN  
     <213> Secuencia Artificial  
     <220>  
 30   <223> Cebador universal  
     <400> 12  
 35                   **agcggataac aattcacac agga**  24  
     <210> 13  
     <211> 18  
 40   <212> ADN  
     <213> Secuencia Artificial  
     <220>  
 45   <223> Cebador universal  
     <400> 13  
                   **tgtaaacga cggccagt**  18  
 50                    <210> 14  
                   <211> 20  
                   <212> ADN  
 55   <213> *Homo sapiens*  
     <400> 14  
                   **ctccatcag aatccaaca**  20  
 60                    <210> 15  
                   <211> 20  
                   <212> ADN  
 65   <213> *Homo sapiens*

## ES 2 343 103 T3

<400> 15  
           **ggcagaaatt gaatcacacc**          20  
 5 <210> 16  
    <211> 18  
    <212> ADN  
    <213> *Homo sapiens*  
 10 <400> 16  
           **tcacgaatct cgctctgc**          18  
 15 <210> 17  
    <211> 19  
    <212> ADN  
    <213> *Homo sapiens*  
 20 <400> 17  
           **gaccaacgtg aaacacagt**          19  
 25 <210> 18  
    <211> 18  
    <212> ADN  
    <213> *Homo sapiens*  
 30 <400> 18  
           **tttctgaag gctccctg**          18  
 35 <210> 19  
    <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> *Homo sapiens*  
 40 <400> 19  
           **tgtctgtagg ctcaggaag**          20  
 45 <210> 20  
    <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> *Homo sapiens*  
 50 <400> 20  
           **cctcttcag ttttagggtc**          20  
 55 <210> 21  
    <211> 19  
    <212> ADN  
    <213> *Homo sapiens*  
 60 <400> 21  
           **cagaagccag tctaggatg**          19  
 65 <210> 22  
    <211> 20

ES 2 343 103 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 22

gtaggcttca ggaagaaatc 20

<210> 23

10 <211> 19

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 23

ttccgcagtt agccttcag 19

<210> 24

20 <211> 398

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 24

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

60

65



ES 2 343 103 T3

5 Gln Lys Leu Phe Gln Leu Gln Ser Lys Asn Met Trp Leu Gln Gln Gln  
 245 250 255  
 Leu Val His Ala His Lys Lys Ala Asp Asn Lys Ser Lys Ile Thr Ile  
 260 265 270  
 Asp Ile His Phe Leu Glu Arg Lys Met Gln His His Leu Leu Lys Glu  
 275 280 285  
 Lys Asn Glu Glu Ile Phe Asn Tyr Asn Asn His Leu Lys Asn Arg Ile  
 290 295 300  
 10 Tyr Gln Tyr Glu Lys Glu Lys Ala Glu Thr Glu Asn Ser  
 305 310 315

<210> 26

15 <211> 44

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 26

Met Gln Lys Ser Val Pro Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys Asn Glu Gln  
 1 5 10 15  
 25 Thr Leu Arg Ala Asp Glu Ile Leu Pro Ser Glu Ser Lys Gln Lys Asp  
 20 25 30  
 Tyr Glu Glu Ser Ser Trp Asp Ser Glu Ser Leu Cys  
 35 40

30 <210> 27

<211> 38

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 27

Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp Glu  
 1 5 10 15  
 40 Ile Leu Pro Ser Glu Ser Lys Gln Lys Asp Tyr Glu Glu Ser Ser Trp  
 20 25 30  
 Asp Ser Glu Ser Leu Cys  
 35

45 <210> 28

<211> 47

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

55 Lys Asp Gly Leu Leu Lys Ala Asn Cys Gly Met Lys Val Ser Ile Pro  
 1 5 10 15  
 Thr Lys Ala Leu Glu Leu Met Asp Met Gln Thr Phe Lys Ala Gly Lys  
 20 25 30  
 Phe Cys Asn Phe Asn Phe Thr Leu Glu Arg Arg Ile Leu Lys Tyr  
 35 40 45

60

<210> 29

<211> 8

65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

# ES 2 343 103 T3

<220>

<223> Sitio de reconocimiento de sistema de purificación por afinidad

5 <400> 29

**Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys**  
**1 5**

10

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> Sitio de reconocimiento de sistema de purificación por afinidad

<400> 30

25

**Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr Glu His**  
**1 5 10 15**  
**His His His His His**  
**20**

30

35

40

45

50

55

60

65