



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 866**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05799643 .1**
96 Fecha de presentación : **21.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1802972**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Procedimiento de detección de cáncer en base a una reacción inmune a BORIS.**

30 Prioridad: **21.09.2004 US 611798 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.09.2009

73 Titular/es: **Government of the United States
America as represented by The Secretary of the
Department of Health and Human Services
6011 Executive Boulevard, Room 325
Rockville, Maryland 20852-3804, US**

72 Inventor/es: **Lobanenkov, Victor, V.;
Loukinov, Dmitri;
Abdullaev, Ziedulla y
Pack, Svetlana**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento de detección de cáncer en base a una reacción inmune a BORIS.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos BORIS y al uso de dichos polipéptidos para la detección de anticuerpos específicos para BORIS en una muestra obtenida a partir de un mamífero. La detección de anticuerpos en un mamífero específico para BORIS es útil, *inter alia*, para la detección de enfermedades proliferativas, tal como

10 **Antecedentes de la invención**

La identificación de antígenos asociados a tumores reconocidos por un sistema inmune mamífero es útil para la

15 diagnosis y tratamiento de cáncer. Se han identificado una diversidad de antígenos asociados a tumores, incluyendo antígenos de cáncer de testículos que están expresados en células de cáncer, pero no en tejidos normales distintos de los testículos. Sin embargo, solamente una minoría de antígenos asociados a tumores son inmunógenos para el

20 BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) es un antígeno asociado a un tumor, que es activado en un amplia diversidad de cánceres humanos. De hecho, la síntesis aberrante del producto de gen BORIS se ha encontrado en más de 300 tumores primarios y líneas de células de cáncer que representan todos los tipos principales de cánceres humanos con ganancias cromosómicas 20q13 recurrentes. Igualmente, se ha encontrado activación de BORIS en todas las líneas de células de cáncer NCI-60 convencionales, que están conservadas por el National Cancer Institute (NCI), y

25 las cuales se piensa que son un conjunto representativo razonablemente completo de cánceres humanos. Un mecanismo de acción mediante el cual se estima que BORIS causa cáncer a través de la interferencia con el mantenimiento de un patrón de metilación apropiado en el genoma mediado por el factor de unión CCCTC (CTCF) (véase Klenova y otros, *Seminars in Cancer Biology*, vol. 12, págs.. 39-414, (2002)).

30 BORIS es también un parólogo de CTCF, el cual contiene todas las once huellas de cinc de CTCF, y que se ha mostrado que promueve el crecimiento que conduce a la transformación (véase Loukinov y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 99, págs. 6806-6811, (2002), y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 03/072799 (PCT/US03/05186)). Se estima que el gen BORIS mapea la región de amplificación asociada a cáncer del cromosoma 20q13.

35 La detección de la expresión aberrante de marcadores de cáncer, tal como el antígeno específico de la próstata (PSA) y el antígeno carcinoembrionario (CEA), son conocidos en la técnica. Sin embargo, estos ensayos detectan únicamente un número limitado de cánceres, y tienen valor predictivo positivo limitado para la detección de cáncer nuevo o recurrente, o para el pronóstico de cáncer. De acuerdo con ello, existe una necesidad en la técnica de identificar

40 antígenos adicionales cuya expresión pueda ligarse a enfermedades proliferativas, tal como cáncer, así como procedimientos de detección de la presencia de dichos antígenos para ayudar en la detección, diagnosis, pronosticación, o investigación de dichos estados de enfermedad.

45 La invención proporciona procedimientos y composiciones útiles para la detección, diagnosis, pronosticación, o investigación de enfermedades asociadas con la expresión de BORIS anormal, tal como cáncer. Estas y otras ventajas de la invención, así como características adicionales de la invención, resultarán evidentes a partir de la descripción de invención aquí proporcionada.

50 **Breve resumen de la invención**

La invención proporciona un procedimiento de detección de una enfermedad asociada con la expresión de BORIS anormal, incluyendo pero sin limitarlo al cáncer, cuyo procedimiento comprende la detección de anticuerpos (por ejemplo, autoanticuerpos) contra BORIS en una muestra obtenida a partir de un mamífero. La invención proporciona igualmente un procedimiento de detección de anticuerpos contra BORIS en una muestra obtenida a partir de un mamífero, cuyo procedimiento comprende la puesta en contacto de la muestra con un polipéptido BORIS y la detección de la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido BORIS.

60 La invención proporciona además polipéptidos BORIS (por ejemplo, polipéptidos que comprenden epítomos de BORIS), composiciones, y kits que comprenden los polipéptidos BORIS. Además, la invención proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmune en un mamífero que comprende la administración de un polipéptido BORIS al mamífero.

Breve descripción de los dibujos

65 La Figura 1 es una gráfica que representa los resultados de ensayos ELISA indirectos para anticuerpos antiBORIS en sueros humanos.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento de detección de una enfermedad caracterizado por la expresión de gen anormal, tal como una enfermedad hiperproliferativa que implica la expresión de BORIS anormal (por ejemplo, 5 cáncer), en un mamífero, cuyo procedimiento comprende el proporcionar una muestra a partir de un mamífero y la detección de anticuerpos contra BORIS en la muestra obtenida a partir del mamífero. La presencia de anticuerpos anti-BORIS en la muestra indica la presencia de la enfermedad en el mamífero. Lo términos “enfermedad proliferativa” y “enfermedad hiperproliferativa” se usan aquí de manera sinónima. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se estima que las enfermedades caracterizadas por expresión de gen anormal, al como cáncer, están asociadas con la expresión 10 anormal de BORIS en tejidos en los que BORIS no se encuentra normalmente (por ejemplo, tejidos distintos de los testículos). Como un resultado de ello, el sistema inmune del mamífero produce anticuerpos contra BORIS que pueden ser detectados en una muestra (por ejemplo, los tejidos, sueros, o corriente sanguínea) obtenida a partir del mamífero enfermo. En la ausencia de una enfermedad de este tipo, BORIS está confinado a los tejidos y órganos en los cuales normalmente se encuentra (por ejemplos, los testículos), y el sistema inmune del mamífero no produce anticuerpos 15 contra BORIS. Por ello, una muestra extraída a partir de un mamífero no enfermo (por ejemplo, un mamífero sin una enfermedad caracterizada por la expresión de gen anormal) no contendrá anticuerpos anti-BORIS. De acuerdo con ello, mediante la detección de la presencia o la ausencia de anticuerpos anti-BORIS en la muestra de un mamífero, el procedimiento de la invención hace posible una determinación de si el mamífero tiene una enfermedad caracterizada por la expresión de gen anormal, especialmente la expresión BORIS anormal, tal como cáncer.

Los términos “BORIS” y “BORIS nativo” se usan aquí de manera sinónima para referirse al polipéptido BORIS tal como se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, tal como se produce o aísla a partir de un mamífero no manipulado 20 genéticamente). De acuerdo con ello, estos términos abarcan cualquier isoforma u homólogo naturales de BORIS. Los términos “anticuerpo anti-BORIS” y “anticuerpos contra BORIS” se usan aquí de manera sinónima para referirse a cualquier anticuerpo que se una a BORIS, incluyendo autoanticuerpos contra BORIS.

El procedimiento de la invención puede usarse para detectar cualquier enfermedad caracterizada por o asociada con la producción anormal de BORIS, y la consecuente producción de anticuerpos anti-BORIS, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, para la detección de cáncer. Tal como se ha mencionado anteriormente, se ha detectado ARNm de 30 BORIS en varios cientos de líneas de células de cáncer y tumor que representan la mayoría de las formas principales de cáncer. De acuerdo con ello, el procedimiento de la invención puede usarse para detectar cualquier tipo de cáncer. Dichos cánceres incluyen, pero sin limitarse a ellos, cáncer de la cavidad oral y de faringe, el sistema digestivo (por ejemplo, el esófago, estómago, intestino pequeño, colon, recto, ano, hígado, vesícula biliar, y páncreas), el sistema respiratorio (por ejemplo, la laringe, pulmón, y bronquios, incluyendo carcinoma de pulmón de célula no pequeña, 35 huesos y articulaciones (por ejemplo, metástasis ósea), tejido blando, la piel (por ejemplo, melanoma), pecho, sistema genital (por ejemplo, cérvix uterino, corpus uterino, vulva ovarica, vagina, próstata, testículos, y pene), el sistema urinario (por ejemplo, vesícula urinaria, riñón, pelvis renal, y uréter), el ojo y órbita, el cerebro y sistema nervioso (por ejemplo glioma), o el sistema endocrino (por ejemplo, tiroides). El cáncer puede ser igualmente un linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin), mieloma múltiple, o leucemia (por ejemplo, leucemia 40 linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, y similares).

Puede usarse cualquier muestra adecuada en la invención. Los tipos de muestras que pueden contener anticuerpos (por ejemplo, autoanticuerpos) son conocidos en la técnica. La muestra puede ser una muestra sólida, tal como una muestra de tejido, o la muestra puede ser fluida tal como una muestra de fluido corporal. Por ejemplo, puede usarse 45 una sección de tejido entero para análisis basado en inmunohistoquímica o puede homogeneizarse para licuar los componentes que se encuentran en el tejido. Preferiblemente, la muestra es un fluido. Las muestras fluidas adecuadas incluyen, pero sin limitarse a ellas, sangre, suero, plasma, linfa, y fluido intersticial.

Puede usarse cualquier procedimiento adecuado de detección de anticuerpos anti-BORIS en una muestra. En la 50 técnica se encuentran disponible procedimientos para la detección de la presencia de anticuerpos contra un antígeno conocido en una muestra.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un procedimiento de detección de anticuerpos específico para BORIS en una muestra obtenida a partir de un mamífero, cuyo procedimiento comprende la puesta en contacto de 55 la muestra con un polipéptido BORIS (por ejemplo, un polipéptido que comprende una porción adecuada de BORIS que comprende uno o más epitopos de BORIS) y la detección de si la muestra contiene anticuerpos anti-BORIS. Por supuesto, la unión del polipéptido BORIS a un anticuerpo en la muestra indica la presencia de anticuerpos anti-BORIS en la muestra. El procedimiento de detección de anticuerpos anti-BORIS puede usarse para cualquier fin adecuado, y es especialmente útil para la detección, pronóstico, control, o investigación de enfermedades caracterizadas por la expresión de gen anormal, especialmente de BORIS anormal, incluyendo sin limitación enfermedades hiperproliferativas tal como cáncer. De acuerdo con ello, el procedimiento de detección de anticuerpos anti-BORIS proporcionado 60 por la invención puede usarse conjuntamente con el procedimiento de detección de una enfermedad proporcionado por la invención.

A este respecto, el término “polipéptido BORIS” tal como se usa aquí, se define como un polipéptido al cual se une un anticuerpo anti-BORIS. Por ello, el término “polipéptido BORIS” tal como se define para los fines de esta invención, abarca, pero sin limitarse a él, a BORIS nativo. Tal como se expone con mayor detalle más adelante, un polipéptido BORIS puede, por ejemplo, comprender, estar constituido esencialmente de, o estar constituido de BORIS, 65

una porción o fragmento de BORIS reconocido por un anticuerpo anti-BORIS, o una variante de BORIS o porción o fragmento del mismo reconocido por un anticuerpo anti-BORIS.

El polipéptido BORIS puede comprender, estar constituido esencialmente de, o estar constituido de la proteína BORIS nativa o una porción de la misma. Las proteínas BORIS de longitud total son conocidas en la técnica y divulgadas, por ejemplo, por Loukinov y otros, véase cita anterior, Klenova y otros, véase cita anterior, y en el GenBank No. de Registro AF36042. Otras isoformas, homólogos, y parálogos pueden aislarse usando las informaciones aquí suministradas y técnicas de rutina.

Cualquier porción adecuada de BORIS puede usarse para detectar anticuerpos específicos para BORIS. Tal como se usa aquí, el término “porción” es sinónimo con el término “fragmento”, usándose ambos de los mismos para referirse a la parte contigua de un polipéptido, que comprende preferiblemente 5 o más aminoácidos. La porción de BORIS puede ser proporcionada por la proteína BORIS de longitud total (por ejemplo, el polipéptido BORIS nativo de longitud total); sin embargo, en ambas realizaciones es conveniente usar una porción más corta de BORIS. De acuerdo con ello, la porción de BORIS puede ser cualquier porción de la proteína BORIS nativa de longitud total que pueda reconocer y unirse a un anticuerpo anti-BORIS *in vitro* o *in vivo*. Se puede determinar si cualquier porción dada de BORIS se une a un anticuerpo anti-BORIS usando técnicas de rutina a la vista de las divulgaciones aquí proporcionadas. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos anti-BORIS a partir de un mamífero usando BORIS nativo. A continuación, la porción de “ensayo” dada de BORIS puede ser puesta en contacto con los anticuerpos anti-BORIS para determinar si los anticuerpos anti-BORIS se unen a la porción de “ensayo” dada de BORIS. Otros procedimientos de determinación de si una porción dada de BORIS puede unirse a un anticuerpo anti-BORIS resultarán evidentes para los expertos normales en la técnica.

Las porciones adecuadas de BORIS incluyen la porción amino-terminal de BORIS (el “dominio N-terminal”), definido como la región que se extiende desde el amino-terminal hasta el dominio de la huella de cinc (el “dominio N-terminal”), o al menos alguna porción de la misma que comprenda aproximadamente 10 o más aminoácidos (por ejemplo, 200 o más, 250 o más, 300 o más, 400 o más, o 500 o más aminoácidos) del dominio N-terminal de BORIS. Una porción preferida de BORIS es el dominio N-terminal de BORIS codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende, está constituida por, o está constituida esencialmente por la SEC ID NO:1.

Otras porciones adecuadas de BORIS incluyen la porción carboxilo-terminal de BORIS, definida como la región de iniciación después del dominio de la huella de cinc y de terminación en el carboxilo-terminal de BORIS (el “dominio C-terminal”), o al menos alguna porción de la misma que comprenda aproximadamente 75 o más aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 100 o más, 200 o más, 300 o más, 400 o más aminoácidos) del dominio C-terminal de BORIS. Una porción preferida de BORIS incluye el dominio C-terminal de BORIS codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende, está constituida esencialmente por, o está constituida por la SEC ID NO:2.

En una realización particularmente preferida de la invención, el polipéptido BORIS comprende al menos una porción de cada uno del dominio N-terminal y el dominio C-terminal, tal como se describe aquí. Más preferiblemente, el polipéptido BORIS comprende el dominio N-terminal y el dominio C-terminal enteros. Se prefiere además que el polipéptido BORIS excluya el dominio de la huella de cinc. Un polipéptido BORIS preferido está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende, está constituida por, o está constituida esencialmente por la SEC ID NO:3.

Pueden usarse incluso porciones más pequeñas de BORIS, siempre y cuando que esté presente un epítipo de BORIS en la porción o fragmento. Por “epítipo” se entiende una secuencia de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo o un receptor de antígeno. Igualmente, a los epítopos se hace referencia en la técnica como “determinantes antigénicos”. Por ejemplo, la porción de BORIS, o el polipéptido BORIS que comprende, está constituida esencialmente por, o está constituida por la porción de BORIS, puede ser menor de aproximadamente 660, 200, 150, 100, 60, 50, 30, 20, 15, ó 12 restos de aminoácidos en longitud, siempre y cuando que esta pueda estar específicamente unida por un anticuerpo que se una a BORIS, y preferiblemente un anticuerpo que se una únicamente a BORIS (es decir, un anticuerpo “específico de BORIS”). Preferiblemente, el polipéptido BORIS comprende al menos aproximadamente 10, 11, ó 12 aminoácidos. Por supuesto, el número preferido de aminoácidos puede igualmente expresarse en términos de intervalos dentro de cualquiera de los límites preferidos anteriormente descritos (por ejemplo, 10-200 aminoácidos, 10-100 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 10-20 aminoácidos, etc.). No obstante, los polipéptidos BORIS que comprenden menos de 11 aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 4, 6, 8, ó 10 o más aminoácidos) entran igualmente dentro del ámbito de la invención.

Cualquier epítipo de BORIS que sea reactivo con un anticuerpo anti-BORIS puede usarse solo, en el contexto de un polipéptido BORIS más grande, insertado dentro de otra proteína (es decir “no-BORIS”), o unida a otra proteína (es decir, “no-BORIS”). Como alternativa, puede usarse más de un epítipo de BORIS. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se estima que los diferentes individuos tendrán respuestas inmunógenas a BORIS en base a las moléculas MHC expresadas sobre sus células que presentan antígenos (por ejemplo, macrófagos). De acuerdo con ello, los epítopos reactivos de BORIS pueden variar de individuo a individuo. Más aún, en algunos pacientes con cáncer ha sido detectada una respuesta de anticuerpo autoreactivo dirigida tanto contra los dominios N-terminal como C-terminal de BORIS. De acuerdo con ello, el procedimiento implica preferiblemente el uso de más de un epítipo de BORIS. Cuando se usa más de un epítipo de BORIS, los diferentes epítopos de BORIS pueden ser proporcionados, por ejemplo, por diversas porciones no contiguas de BORIS usadas simultáneamente (por ejemplo, dos o más polipéptidos

comprendiendo cada uno de ellos una porción diferente de BORIS) o ligadas conjuntamente y usadas como un único reactivo (por ejemplo, un único polipéptido BORIS comprendiendo dos o más porciones diferentes de BORIS).

El polipéptido BORIS puede unirse a otras biomoléculas, tales como, por ejemplo, proteínas, polipéptidos, lípidos, carbohidratos, prenilo, y partes acilo, y ácidos nucleicos. Cuando otra proteína o polipéptido está ligado con una porción de BORIS, preferiblemente no está relacionada con BORIS (por ejemplo, el otro polipéptido tendrá menos de 40% de identidad de secuencia de aminoácidos con BORIS). En una realización preferida de la invención, el polipéptido BORIS comprende una secuencia de aminoácido de ligador flexible. Los ligadores flexibles se usan en la técnica para unir dos polipéptidos diferentes, tal como, por ejemplo, en la construcción de proteínas de fusión o quiméricas. En realizaciones en las que el polipéptido BORIS comprende dos o más porciones de BORIS, por ejemplo, una porción de dominio N-terminal y una porción de dominio C-terminal de BORIS, puede usarse un ligador flexible para unir el dominio N-terminal y el dominio C-terminal para formar una única molécula polipéptida. El ligador flexible puede ser cualquier secuencia de aminoácido adecuada que pueda usarse para unir dominios polipéptidos separados. A este respecto, el ligador flexible preferiblemente comprende aproximadamente 5 o más aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 6 o más, 7 o más, o 9 o más aminoácidos), más preferiblemente aproximadamente 10 o más aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 11 o más, 12 o más, o 14 o más aminoácidos), y lo más preferiblemente aproximadamente 15 o más aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 17 o más, 20 o más, o 25 o más aminoácidos). El ligador flexible para uso en la presente invención comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:5; sin embargo, son conocidas en la técnica otras secuencias ligadoras así como procedimientos para la unión de dominios polipéptidos usando ligadores flexibles (véase, por ejemplo, Imanishi y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 333, (nº. 1), págs. 167-73, (2005); Lin y otros, *Eur. Cytoquine Netw.*, vol. 15, (nº. 3), págs. 240-6, (2004)).

El polipéptido BORIS puede estar unido a un resto de señalización (también conocido como un marcador detectable). La identidad y uso de los restos de señalización es bien conocido en la técnica. Un resto de señalización es una molécula capaz de indicar la presencia de un analito o reactivo en una muestra, usualmente después de la manipulación de la muestra. Frecuentemente, dichas manipulaciones incluyen la incubación de una muestra y los reactivos de detección apropiados bajo condiciones que permiten unirse los dos restos conjuntamente, si están presentes, y, a continuación, la separación de cualquiera de los restos marcados de la muestra mediante lavado, filtración, u otras técnicas adecuadas. Otros procedimientos de trabajo con restos de señalización son bien conocidos en la técnica. Los restos de señalización adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, moléculas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde), interruptores fluorescentes, epítopos y haptenos para anticuerpos que no reconocen a BORIS (por ejemplo, el bien conocido epítipo FLAG), enzimas (por ejemplo, cromógenas o luminiscentes (tal como peroxidasa de rábano picante o β -galactosidasa)), un ácido nucleico que pueda ser amplificado o específicamente hibridado a una sonda, botina, avidina, o estreptavidina, lecitinas y coloides. Los procedimientos para el ligamiento de proteínas con marcadores detectables y soportes sólidos son bien conocidos en la técnica.

Puesto que la función primaria del polipéptido BORIS es unirse con anticuerpos anti-BORIS en la muestra, el polipéptido BORIS no necesita comprender una porción de BORIS *per se*. Al contrario, el polipéptido BORIS puede ser un polipéptido que se une con un anticuerpo que se une a BORIS. A este respecto, el polipéptido puede comprender, estar constituido esencialmente por, o estar constituido por una variante de BORIS. Tal como se usa aquí, el término “variante de BORIS” significa una variante de proteína BORIS nativa de longitud total o una variante de una porción de BORIS, tal como se describe aquí. El técnico experto puede generar y caracterizar variantes de BORIS por su capacidad para unirse con un anticuerpo anti-BORIS o un fragmento funcional del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab)₂) usando la información aquí suministrada y procedimientos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de BORIS pueden generarse usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria de una secuencia de ácido nucleico que codifica a BORIS. Las características de unión de una variante de BORIS así producida pueden determinarse, por ejemplo, usando anticuerpos contra BORIS obtenidos a partir del suero de un mamífero con cáncer. Dichos anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, usando una proteína BORIS nativa.

Una variante de BORIS comparte, de manera deseable, una o más regiones de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína BORIS nativa. A este respecto, preferiblemente, la variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 50% idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90% idéntica) a un polipéptido BORIS nativo. Más preferiblemente, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75% idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 95% idéntica) a una secuencia de aminoácido de BORIS nativo. Lo más preferiblemente, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90% idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 99% idéntica) a una secuencia de aminoácidos de BORIS nativo. Tal como se usa aquí, la identidad de la secuencia es la que se determina usando los algoritmos BLAST bien conocidos (por ejemplo, BLASTp, BLAST2.1, BL2SEQ, y posteriores versiones de los mismos). Las variantes de BORIS capaces de unirse a anticuerpos anti-BORIS tienen, preferiblemente, al menos 5, 6, ó 7 restos de aminoácidos que son idénticos a BORIS sobre una ventana de ocho restos de aminoácidos.

Las variantes de BORIS en las cuales una alteración destruye la capacidad de la variante para unirse con, o unirse específicamente con, un anticuerpo anti-BORIS pueden usarse como un control negativo.

El anticuerpo detectado en la invención se une, preferiblemente, a BORIS mejor que al factor de unión CCCTC (CTCF), o no se une en absoluto a CTCF. De acuerdo con ello, el procedimiento de la invención comprende, preferiblemente, la detección de un anticuerpo anti-BORIS con una afinidad de unión por BORIS que sea mayor que su afinidad de unión por CTCF. Esto es particularmente cierto cuando la porción de BORIS usada comprende el dominio de huella de cinc de BORIS. Más preferiblemente, la constante de disociación (K_d) de unión bajo condiciones convencionales entre el anticuerpo detectado por el procedimiento de la invención y BORIS es al menos 10 veces menor, más preferiblemente al menos 100 veces menor, o incluso 1000 veces menor que la K_d de unión entre el mismo anticuerpo y CTCF. En algunas realizaciones, la unión de anticuerpos en un suero de paciente a CTCF puede usarse como un control negativo.

El mamífero usado conjuntamente con los procedimientos aquí descritos puede ser cualquier mamífero adecuado, tal como perros, gatos, vacas, cabras, cerdos, ratones, ratas, cobayos, conejos, ratas asiáticas, monos, y hamsters. Preferiblemente, el mamífero es un ratón, y más preferiblemente un humano.

La muestra puede ponerse en contacto con un polipéptido BORIS usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con un polipéptido BORIS *in vitro*. Los procedimientos *in vitro* para la detección de anticuerpos en una muestra son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayo inmunoenzimático (ELISA), cromatografía de afinidad, y radioinmunoensayo (RIA).

En una realización preferida, el procedimiento de detección de cáncer o procedimiento de detección de anticuerpos anti-BORIS incluye la determinación de la clase y/o subclase de los anticuerpos presentes en el cuerpo del paciente, o muestra obtenida a partir del mismo, que son reactivos con BORIS. Un experto normal en la técnica comprenderá que las cinco clases principales de inmunoglobulina humana (o “isotipos”) son la inmunoglobulina M (es decir, IgM), IgD, IgG, IgA, e IgE, las cuales están típicamente definidas por la estructura de las regiones constantes de la cadena pesada del anticuerpo. La cadena ligera de una molécula de anticuerpo humana está típicamente clasificada en la técnica como o bien una cadena lambda (λ) o una cadena kappa (κ). Los anticuerpos IgG pueden subdividirse además en cuatro subtipos (es decir, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), en tanto que los anticuerpos IgA están típicamente subdivididos en dos subtipos (es decir, IgA1 e IgA2). Es bien conocida en la técnica la forma de determinar la clase y subclase de anticuerpos aislados o purificados. Por ejemplo, los anticuerpos reactivos con BORIS pueden aislarse a partir de un suero de humano mediante inmunocromatografía. Los pocillos de las placas de microvaloración pueden recubrirse con 10 μ g/ml de inmunoglobulina anti-humana durante una noche a 4°C. Después del bloqueo con BSA al 5%, las placas se hacen reaccionar con 10 μ g/ml de un anticuerpo monoclonal o con controles de isotipos purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, los pocillos pueden hacerse reaccionar con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específica de IgG1, específica de IgG2, específica de IgG3 o específica de IgG4 humano o específica de IgM humano. Después de lavadas, las placas pueden revelarse con un sustrato luminógeno o cromógeno y analizarse para determinar su revelado a la luz o de color.

Los procedimientos de detección de una enfermedad y de detección de anticuerpos anti-BORIS pueden usarse de diferentes formas. Por ejemplo, el procedimiento puede usarse simplemente para establecer la existencia de un estado de enfermedad para los fines de diagnóstico o de rastreo. Además, el procedimiento puede usarse, por ejemplo, para controlar el status (por ejemplo, progresión o regresión) de un estado de enfermedad, tal como mediante la comparación del nivel de anticuerpo anti-BORIS (o niveles de expresión de BORIS) a partir de muestras diferentes a lo largo del tiempo. Un uso de este tipo sería de ayuda en el control de la respuesta de los pacientes a un régimen terapéutico particular.

La invención proporciona igualmente una porción inmunoreactiva aislada de BORIS. Por “porción inmunoreactiva” se entiende una porción de la proteína BORIS que puede generar una respuesta inmune en un mamífero *in vitro*, unirse a un anticuerpo anti-BORIS *in vivo* o *in vitro*, o comprender uno o más epítomos de BORIS. Una porción de BORIS está aislada si está sintetizada, o si está separada de su entorno natural. La porción inmunoreactiva aislada de BORIS puede comprender, estar constituida esencialmente por, o estar constituida por cualquier porción de BORIS o cualquier polipéptido BORIS descrito aquí como útil conjuntamente con el procedimiento de detección de una enfermedad o procedimiento de detección de un anticuerpo anti-BORIS, incluyendo sin limitación las secuencias de aminoácidos codificadas por cualquiera de las SEC ID Nos: 1-3.

El polipéptido BORIS o porción de BORIS, tal como se describe aquí, puede generarse mediante el uso de cualquier procedimiento adecuado. A este respecto, las secuencias de ácido nucleico que codifican fragmentos de BORIS pueden producirse de manera sintética y expresarse en una célula huésped apropiada, dando como resultado, de esta forma, la producción de una porción de un polipéptido BORIS. Además, pueden sintetizarse fragmentos de péptido BORIS usando procedimientos de síntesis de proteínas conocidos en la técnica. Como alternativa, pueden generarse fragmentos de polipéptido BORIS usando proteasas que se escinden dentro del polipéptido BORIS de longitud total. Tal como se ha expuesto anteriormente, la porción de BORIS puede marcarse con un resto de señalización o marcador detectable, o ligarse a un soporte sólido.

La invención proporciona además una composición que comprende un polipéptido BORIS, tal como se ha descrito aquí, en la que el polipéptido BORIS puede opcionalmente marcarse con un marcador detectable. De manera ideal, la composición comprende un polipéptido BORIS y un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente (por ejemplo, aceptable fisiológicamente). La frase “vehículo aceptable farmacéuticamente”, tal como se usa aquí, se refiere a un medio vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y que

no es tóxico para el huésped o paciente. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden presentarse en una diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificaciones sólidas, semi-sólidas y líquidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones o suspensiones líquidas, liposomas, soluciones inyectables e infusibles. Las preparaciones inhalables, tales como aerosoles, se encuentran igualmente incluidas. Las formulaciones preferidas son las dirigidas a aplicaciones oral, intranasal y parenteral, pero se comprenderá que la forma preferida dependerá del diagnóstico o aplicación terapéutica particular. Los procedimientos para la formulación y preparación de composiciones farmacéuticas son bien conocidos en la técnica y se encuentran descritos, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th. Ed., (1985), *The Merck Index*, 11th ed., (Merck & Co., 1989), y por Langer, en *Science*, vol. 249, págs. 1527-1533, (1990).

El polipéptido BORIS tal como se describe aquí, incluyendo una proteína BORIS nativa de longitud total o porciones, fragmentos, quimeras, fusiones, y derivados aislados de la misma, puede usarse para cualquier fin. Además de ser útil en el procedimiento de detección de una enfermedad y un procedimiento de detección de anticuerpos anti-BORIS, el polipéptido BORIS puede usarse para otros fines, tal como para la inducción de una respuesta inmune en un mamífero. Dichas respuestas inmunes tienen múltiples usos. Por ejemplo, los anticuerpos y otras moléculas relacionadas con la inmunidad específicas para BORIS pueden aislarse y usarse para investigación, reactivos de control útiles en un procedimiento para la detección de la expresión de BORIS en un mamífero, y como un procedimiento para la destrucción de células de cáncer que están presentes o pudieran surgir en un mamífero. A este respecto, la invención proporciona, como un aspecto relacionado, un procedimiento de inducción de una respuesta inmune en un mamífero que comprende la administración a un mamífero de un polipéptido BORIS tal como se ha definido aquí. Los procedimientos adecuados de administración son conocidos en la técnica. Todos los otros aspectos del procedimiento de inducción de una respuesta inmune son tal como previamente se han descrito aquí.

Un polipéptido BORIS tal como se describe aquí, incluyendo una proteína BORIS nativa de longitud total o porciones, fragmentos, quimeras, fusiones, y derivados aislados de la misma, puede también suministrarse en un kit. De acuerdo con ello, en un aspecto relacionado, la invención proporciona un kit que comprende un polipéptido BORIS tal como se ha descrito aquí y un reactivo que genera una señal cuando un anticuerpo se une a una porción de un polipéptido BORIS. Dichos reactivos son conocidos en la técnica. Preferiblemente, el kit comprende además instrucciones para la determinación de si una muestra obtenida a partir de un mamífero comprende anticuerpos específicos para BORIS, cuyas instrucciones opcionalmente incluyen criterios para la determinación de si una célula de cáncer está probablemente presente en el mamífero a partir del cual se ha obtenido la muestra. Este kit puede usarse para cualquier fin, tal como en la investigación de la expresión de BORIS y enfermedades asociadas con el mismo, y para la detección de anticuerpos de BORIS y la detección de cáncer en un mamífero.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no deberían considerarse como limitativos de ninguna manera de su ámbito.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que la detección mediante ELISA indirecto de anticuerpos de suero contra BORIS puede usarse para la diagnosis de cáncer en pacientes humanos.

Con el fin de detectar anticuerpos contra BORIS presentes en sueros humanos, se usó un ELISA indirecto que usa regiones de BORIS que no tienen homología con CTCF como cebo. A este respecto, se generaron tres constructos de plásmidos diferentes que codifican porciones de los dominios N-terminal y/o C-terminal de BORIS, usando el plásmido pGEX-5x1 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La secuencia de la proteína BORIS de longitud total es la suministrada por Loukinov y otros, véase cita anterior, Klenova y otros, véase cita anterior, y en el GenBank No. de Registro AF336042. El primer plásmido contenía el dominio N-terminal de BORIS correspondiente a los nucleótidos 90-867 de la secuencia de ácido nucleico de BORIS publicada (GenBank No. de Registro AF336042) y un ligador flexible (SEC ID NO:5). El segundo plásmido contenía el dominio C-terminal de BORIS correspondiente a los nucleótidos 1761-2098 de la secuencia de ácido nucleico de BORIS publicada. El tercer plásmido contenía tanto el dominio N-terminal como el dominio C-terminal de BORIS del segundo plásmido conjuntamente unido mediante el ligador flexible. Cada secuencia de BORIS se expresó como parte de una proteína de fusión con glutatona-S-transferasa (GST) para facilitar la purificación.

Se absorbieron concentraciones adecuadas (por ejemplo, aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$) de cada una de las proteínas de fusión de BORIS en un tampón de recubrimiento adecuado (por ejemplo, Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 30 mM, pH 9,6 con NaN_3 al 0,02%) sobre placas de microvaloración de 96 pocillos durante un tiempo adecuado y a una temperatura adecuada (por ejemplo, durante una noche a 4°C). A continuación, las placas se lavaron con una solución adecuada (por ejemplo, Tween-20 al 0,05%/PBS) y se bloquearon (por ejemplo, con 100 μl por pocillo de una solución de BSA o caseína durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente (TA)). Después del lavado, se agregaron diluciones seriadas de suero humano en un reactivo de bloqueo adecuado, tal como BSA o caseína, y se incubaron bajo condiciones adecuadas (por ejemplo, durante aproximadamente 2 horas a 37°C en un incubador saturado con agua). El suero se obtuvo de pacientes humanos que sufrían de glioma, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, y cáncer de próstata.

Las placas se lavaron y se agregó anticuerpo secundario diluido (incluyendo, por ejemplo, conjugados de fosfatasa alcalina específico de IgG1, específico de IgG2, específico de IgG3, específico de IgG4 anti-humano o específico de IgM

humano) en un agente de bloqueo y se incubaron durante un período adecuado de tiempo bajo condiciones adecuadas (por ejemplo, aproximadamente 1 hora a 37°C). A continuación, las placas se lavaron, se incubaron con reactivos de visualización bajo condiciones adecuadas durante tiempos adecuados, la reacción se interrumpió, y se determinaron los resultados.

Usando la proteína de fusión de BORIS que comprende el dominio N-terminal ligado al dominio C-terminal de BORIS, los sueros procedentes de cuarenta y siete pacientes de cáncer fueron positivos para anticuerpos anti-BORIS (véase Figura 1). La Figura 1 muestra que el ELISA de los sueros procedentes de seis sujetos normales tenían una lectura de placa de microvaloración media de aproximadamente 0,1. Los sueros procedentes diecisiete pacientes con gliomas tenían una lectura de placa de microvaloración media mayor de 0,15, los procedentes nueve pacientes con cáncer de pulmón una media de aproximadamente 0,3, los procedentes quince pacientes con cáncer de pecho una media por encima de 0,4, y los procedentes seis pacientes con cáncer de próstata una media por encima de 0,2. Las diferencias entre cada media de los grupos de cáncer y las de los sueros humanos normales fueron estadísticamente significativas.

Los anticuerpos contra el fragmento N-terminal de la proteína de fusión de BORIS codificada por el primer plásmido (por ejemplo, sin el dominio C-terminal) se detectaron en sueros humanos, pero a niveles más bajos que los anticuerpos específicos contra el polipéptido BORIS codificado por el tercer plásmido. Los anticuerpos contra el fragmento C-terminal de la proteína de fusión de BORIS codificada mediante el segundo plásmido (por ejemplo, sin el dominio N-terminal) no fueron detectables.

Este ejemplo demuestra que el uso de un polipéptido BORIS para la detección de anticuerpos anti-BORIS en suero es un procedimiento altamente específico para la diagnosis de una amplia diversidad de cánceres.

Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patentes, y patentes, citadas aquí son por la presente incorporadas por referencias en la misma extensión que si cada referencia fuera individual y específicamente indicadas para ser incorporada por referencia y estuvieran expuestas aquí en su totalidad.

El uso de los términos “un” y “uno” y “el” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) han de considerarse que abarcan tanto el singular como el plural, salvo que se indique lo contrario aquí o claramente entre en contradicción con el contexto. Los términos “comprendiendo”, “teniendo”, “incluyendo”, y “conteniendo” han de considerarse como términos abiertos (es decir, significando “incluyendo, pero no limitado a,”) salvo que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores aquí están puramente destinados a servir como un procedimiento taquigráfico de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, salvo que se indique lo contrario aquí, y cada valor separado se incorpora dentro de la memoria descriptiva como si estos fueran mencionados individualmente aquí. Todos los procedimientos aquí descritos pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado salvo que se indique lo contrario aquí o entre claramente en contradicción con el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o de lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) aquí proporcionado, se entiende que está destinado puramente a iluminar mejor la invención y no plantean ninguna limitación sobre el ámbito de la invención salvo que se reivindique lo contrario. Ninguna forma de lenguaje en la memoria descriptiva debería considerarse como indicativa de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

Las realizaciones preferidas de esta invención se describen aquí, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Pueden llegar a ser evidentes variaciones de las realizaciones preferidas para los expertos normales en la técnica tras la lectura de la descripción precedente. Los inventores esperan que los técnicos expertos usen dichas variaciones de manera apropiada, y los inventores dan por supuesto que la invención sea llevada a la práctica de manera diferente a la descrita específicamente aquí. De acuerdo con ello, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia sujeto citadas en las reivindicaciones adjuntas a la misma tal como se permite por la ley aplicable. Más aún, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención, salvo que se indique lo contrario aquí o de otra forma claramente entre en contradicción con el contexto.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de un cáncer **caracterizado** por la expresión del polipéptido BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) anormal en un mamífero que comprende la detección de anticuerpos contra BORIS en una muestra obtenida a partir del mamífero, en el que la presencia de anticuerpos contra BORIS en la muestra indica la presencia del cáncer del mamífero.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los anticuerpos contra BORIS se detectan mediante:
 - (a) la puesta en contacto de la muestra con un polipéptido BORIS, y
 - (b) la detección de la unión del polipéptido BORIS con un anticuerpo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que el cáncer está seleccionado entre el grupo constituido por cáncer de pecho, glioma, cáncer de pulmón, y cáncer de próstata.
4. Un procedimiento de detección anticuerpos anti-BORIS en una muestra obtenida a partir de un mamífero que comprende:
 - (a) la puesta en contacto de la muestra con un polipéptido BORIS, y
 - (b) la detección de la unión del polipéptido BORIS con un anticuerpo,en el que la unión del polipéptido BORIS con el anticuerpo indica la presencia de anticuerpos anti-BORIS.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el mamífero es un ser humano.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la muestra es fluida.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el fluido está seleccionado entre el grupo constituido por sangre, suero, plasma, linfa, y fluido intersticial.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido BORIS comprende un polipéptido BORIS nativo de longitud total.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el polipéptido BORIS comprende al menos una porción del dominio N-terminal de BORIS.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el polipéptido BORIS comprende al menos 200 aminoácidos procedentes del dominio N-terminal de BORIS.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el polipéptido BORIS comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID NO:1.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el polipéptido BORIS comprende al menos una porción del dominio C-terminal de BORIS.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el polipéptido BORIS comprende al menos 100 aminoácidos procedentes del dominio C-terminal de BORIS.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el polipéptido BORIS comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID NO: 2.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el polipéptido BORIS comprende al menos una porción de los dominios N-terminal y C-terminal de BORIS.
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el polipéptido BORIS comprende además un ligador flexible.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el ligador flexible comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5.
18. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el polipéptido BORIS no comprende la región de huella de cinc de BORIS.
19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el polipéptido BORIS comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID NO: 3.

ES 2 325 866 T3

20. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, 9, 12, y 15, en el que el polipéptido BORIS comprende menos de 60 aminoácidos.

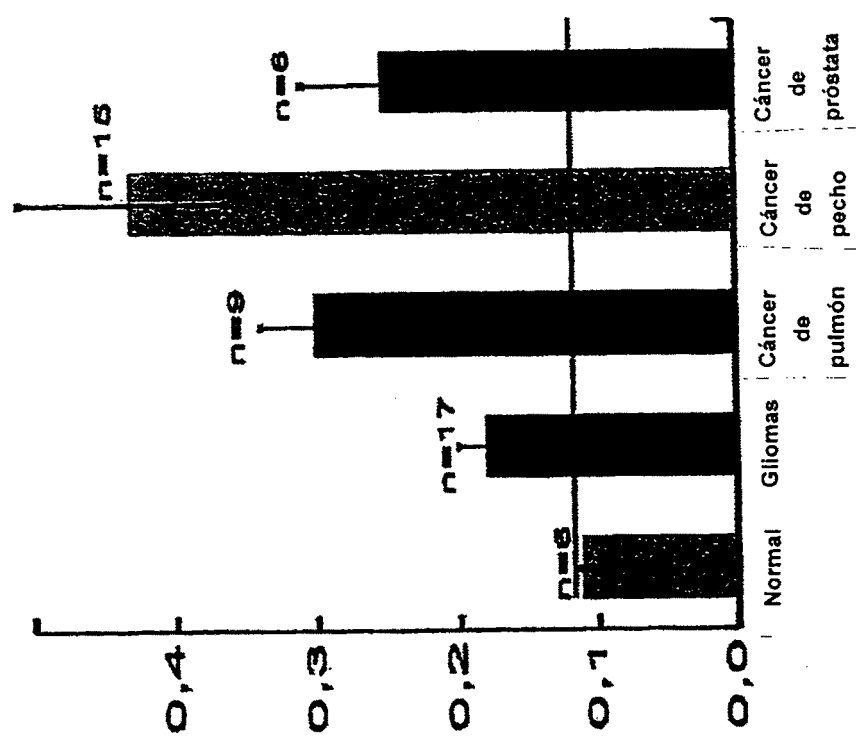
21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el polipéptido BORIS comprende 10-20 aminoácidos.

22. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que el polipéptido tiene al menos ocho restos de aminoácidos y específicamente unidos con un anticuerpo BORIS.

23. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, que comprende además la determinación de la clase del anticuerpo que se une con el polipéptido BORIS.

24. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en el que el anticuerpo detectado tiene una afinidad por BORIS que es mayor que su afinidad de unión por el factor de unión CCCTC (CTCF).

FIGURA 1



ES 2 325 866 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Gobierno de los Estados Unidos de América, representado por el Secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos	
	<120> Procedimiento de detección de cáncer basado en una reacción inmune contra BORIS	
10	<130> EP50655FZ163pau	
	<140> EP 05 799 643.	
	<141> 2005-09-21	
15	<150> US 60/611.798	
	<151> 2004-09-21	
20	<150> PCT/US2005/033796	
	<151> 2005-09-21	
	<160> 5	
25	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 778	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Sintético	
	<400> 1	
40	atggcagcca ctgagatctc tgtcctttct gagcaattca ccaagatcaa agaactcgag	60
	ttgatgccgg aaaaaggcct gaaggaggag gaaaaagacg gagtgtgcag agagaaagac	120
	catcggagcc ctagtgagtt ggaggccgag cgtacctctg gggccttcca ggacagcgtc	180
45	ctggaggaag aagtggagct ggtgctggcc ccctcggagg agagcgagaa gtacatcctg	240
	accctgcaga cgggtgcactt cacttctgaa gctgtggagt tgcaggatat gagcttgctg	300
	agcatacagc agcaagaagg ggtgcagggt gtggtgcaac agcctggccc tgggttgctg	360
50	tggcttgagg aaggggccccg gcagagcctg cagcagtgtg tggccattag tatccagcaa	420
	gagctgtact ccccgcaga gatggagggt ttgcagttcc acgctctaga ggagaatgtg	480
55	atggtggcca gtgaagacag taagttagcg gtgagcctgg ctgaaactgc tggactgatc	540
	aagctcgagg aagagcagga gaagaaccag ttattggctg aaagaacaaa ggagcagctc	600
	ttttttgtgg aaacaatgtc aggágtgaa agaagtgacg aaattgttct cacagtttca	660
60	aattcaaatg tggaagaaca agaggatcaa cctacagctg gtcaagcaga tgctgaaaag	720
	gccaaatcta caaaaaatca aagaaagaca aagggagcaa aaggaacctt ccactgtg	778
	<210> 2	
65	<211> 338	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 325 866 T3

<220>

<223> Sintético

5 <400> 2

tggattaacc tgcacagaca ttcggagaag tgtggatcag gggaagcaaa gtcggctgct 60

10 **tcaggaaagg gaagaagaac aagaaagagg aagcagacca tcctgaagga agccacaaag 120**
ggtcagaagg aagctgcgaa gggatggaag gaagccgcga acggagacga agctgctgct 180
gaggaggctt ccaccacgaa gggagaacag ttcccaggag agatgtttcc tgtcgctgct 240
agagaaacca cagccagagt caaagaggaa gtggatgaag gcgtgacctg tgaaatgctc 300
ctcaacacga tggataagtg agagggattc gggttgctg 338

<210> 3

20 <211> 1160

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Sintético

<400> 3

30 **atggcagcca ctgagatctc tgtcctttct gagcaattca ccaagatcaa agaactcgag 60**
ttgatgccgg aaaaaggcct gaaggaggag gaaaagacg gagtgtgcag agagaaagac 120
catcgagacc ctagtgagtt ggaggccgag cgtacctctg gggccttcca ggacagcgtc 180
35 **ctggaggaag aagtggagct ggtgctggcc cctcggagg agagcgagaa gtacatcctg 240**
accctgcaga cggtgcactt cacttctgaa gctgtggagt tgcaggatat gagcttgctg 300
agcatacagc agcaagaagg ggtgcagggtg gtggtgcaac agcctggccc tgggttgctg 360
40 **tggcttgagg aagggtcccg gcagagcctg cagcagtggtg tggccattag tatccagcaa 420**
gagctgtact ccccgaaga gatggagggtg ttgcagttcc acgctctaga ggagaatgtg 480
atggtggcca gtgaagacag taagttagcg gtgagcctgg ctgaaactgc tggactgac 540
45 **aagctcgagg aagagcagga gaagaaccag ttattggctg aaagaacaaa ggagcagctc 600**
ttttttgtgg aaacaatgtc aggagatgaa agaagtgcg aaattgttct cacagtttca 660
aattcaaatg tggagaaca agaggatcaa cctacagctg gtcaagcaga tgctgaaaag 720
50 **gccaaatcta caaaaaatca aagaaagaca aaggagagcaa aaggaacctt ccactgtggt 780**
ggcgggtggct ccggtggcgg tggctccggt ggcgggtggct cctggattaa cctgcacaga 840
cattcggaga agtgtggatc aggggaagca aagtcggctg cttcaggaaa ggaagaaga 900
55 **acaagaaaga ggaagcagac catcctgaag gaagccaaa agggtcagaa ggaagctgcg 960**
aagggátgga aggaagccgc gaacggagac gaagctgctg ctgaggaggc ttccaccacg 1020
aaggggagaac agttcccagg agagatgttt cctgtcgctt gcagagaaac cacagccaga 1080
60 **gtcaagaggg aagtggatga aggcgtgacc tgtgaaatgc tcctcaacac gatggataag 1140**
tgagaggggat tcgggttgctg 1160

<210> 4

65 <211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 325 866 T3

<220>

<223> Sintético

5 <400> 4

ggtggcggtg gctccggtgg cggtagctcc ggtggcggtg gctcc

45

10 <210> 5

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 5

25 **Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**
1 5 10 15

30

35

40

45

50

55

60

65