



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 281 416**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01926549 .5**

(86) Fecha de presentación : **02.04.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1272668**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

(54) Título: **Métodos, composiciones y sistemas para la detección y monitorización del cáncer de mama.**

(30) Prioridad: **03.04.2000 US 194241 P**  
**20.07.2000 US 219862 P**  
**27.07.2000 US 221300 P**  
**18.12.2000 US 256592 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.10.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.10.2007**

(73) Titular/es: **CORIXA CORPORATION**  
**553 Old Corvallis Road**  
**Hamilton, Montana 59840-3131, US**

(72) Inventor/es: **Houghton, Raymond, L.;**  
**Dillon, Davin, C.;**  
**Molesh, David, Alan;**  
**Xu, Jiangchun;**  
**Zehentner, Barbara y**  
**Persing, David, H.**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 281 416 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

Métodos, composiciones y sistemas para la detección y monitorización del cáncer de mama.

5 **Campo técnico del invento**

El presente invento se refiere, en general, al campo de la diagnosis del cáncer. Más específicamente, el presente invento se refiere a métodos, composiciones y sistemas para la detección del cáncer en que se emplean la hibridación y/o multiplicación de oligonucleótidos para detectar simultáneamente dos o más polinucleótidos tisularmente específicos en una muestra biológica de la que se sospecha que contiene células cancerosas.

**Antecedentes del invento**

El cáncer sigue siendo un problema sanitario significativo en todo el mundo. El fallo de los regímenes convencionales para el tratamiento del cáncer puede atribuirse habitualmente, en parte, a un diagnóstico retrasado de la enfermedad. Aunque se han realizado progresos significativos en el área del diagnóstico del cáncer, aún existe la necesidad de metodologías de detección mejoradas que permitan una determinación precoz, fiable y sensible de la presencia de células cancerosas.

En los Estados Unidos, el cáncer de mama es el segundo en mortalidad entre las mujeres, sólo tras el cáncer de pulmón, afectando a más de 180.000 mujeres cada año y dando lugar a aproximadamente 40.000-50.000 muertes anuales. Para las mujeres de América del Norte, la probabilidad de verse afectadas en su vida por un cáncer de mama es de uno entre ocho.

La gestión de la enfermedad se basa actualmente en una combinación de un diagnóstico precoz (por medio de procedimientos rutinarios de exploración de las mamas) y un tratamiento agresivo, el cual puede incluir uno o más de una diversidad de tratamientos tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal. El curso del tratamiento para un cáncer de mama particular es a menudo seleccionado basándose en una diversidad de parámetros de pronóstico, incluyendo el análisis de marcadores tumorales específicos. Véase, por ejemplo, Porter-Jordan *et al.*, *Breast Cancer* 8: 73-100 (1994). Sin embargo, el uso de marcadores establecidos conduce a menudo a un resultado que es difícil de interpretar, y la elevada mortalidad observada en los pacientes con cáncer de mama indica que se necesitan mejoras en el diagnóstico de la enfermedad.

La reciente introducción, en el tratamiento del cáncer de mama, de planteamientos inmunoterapéuticos que se dirigen a Her2/neu ha proporcionado una motivación significativa para identificar genes específicos de cáncer de mama adicionales como dianas para anticuerpos terapéuticos y para vacunas contra células T, así como para el diagnóstico de la enfermedad. Con este fin, se ha identificado la mamaglobina como uno de los genes más específicos de mama descubiertos hasta la fecha, expresándose en aproximadamente el 70-80% de los cánceres de mama. A causa de su distribución muy tisularmente específica, la detección de la expresión del gen de la mamaglobina ha sido utilizada para identificar lesiones micrometastásicas en tejidos de ganglio linfático y, más recientemente, para detectar células de cáncer de mama circulantes en la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y con lesiones primarias y metastásicas conocidas.

La mamaglobina es un producto homólogo de una uteroglobina de conejo y de la subunidad C3 de la proteína ligante de esteroides de rata, y es una proteína de bajo peso molecular que está muy glicosilada [Watson *et al.*, *Cancer Res.* 56: 860-5 (1996); Watson *et al.*, *Cancer Res.* 59: 3028-3031 (1999); Watson *et al.*, *Oncogene* 16: 817-24 (1998)]. Se ha comunicado que la mamaglobina, por contraste con sus productos homólogos, es específica de la mama, y se ha descrito su sobreexpresión en biopsias de tumores de mama (23%) y en tumores de mama primarios y metastásicos (~ 75%), comunicándose la detección de expresión de mRNA de mamaglobina en el 91% de los ganglios linfáticos de los pacientes con cáncer metastásico de mama [Leygue *et al.*, *J. Pathol.* 189: 28-33 (1999), y Min *et al.*, *Cancer Res.* 58: 4581-4584 (1998)].

Puesto que la expresión del gen de la mamaglobina no es una característica universal del cáncer de mama, la detección de este único gen puede resultar insuficiente para permitir la detección fiable de todos los cánceres de mama. En consecuencia, lo que se necesita en la técnica es una metodología en que se emplee la detección de dos o más genes específicos del cáncer de mama con objeto de mejorar la sensibilidad y la fiabilidad de la detección de micrometástasis, por ejemplo, en ganglios linfáticos y médula ósea, y/o para el reconocimiento de células independientes del anclaje en la circulación periférica.

El presente invento alcanza estos y otros objetivos relacionados al proporcionar métodos que son útiles para la identificación de polinucleótidos tisularmente específicos, en particular polinucleótidos tumoralmente específicos, así como métodos, composiciones y sistemas para la detección y el control de células cancerosas en un paciente afectado por la enfermedad.

En un primer aspecto del presente invento, se proporciona un método para detectar la presencia de una célula de cáncer de mama, método que comprende las operaciones de:

- (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con un primer oligonucleótido que se hibrida con un primer polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en mamaglobina y lipofilina B;

- (b) poner dicha muestra biológica en contacto con un segundo oligonucleótido que se hibrida con una segunda secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia polinucleotídica de GABA $\pi$  (B899P);

- (c) detectar en dicha muestra biológica una cantidad del oligonucleótido hibridado de las operaciones (a) y (b); y

- (d) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad de polinucleótido que se hibrida con los oligonucleótidos de las operaciones (a) y (b) y determinar, a partir de dicha comparación, la presencia o ausencia de un cáncer en el paciente.

Preferiblemente, dicho primer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 73, ID. SEC. n° 74 e ID. SEC. n° 76, o su complemento; y dicho segundo polinucleótido comprende el polinucleótido expuesto en la ID. SEC. n° 75, o su complemento.

Ventajosamente, el método comprende además:

- (e) poner dicha muestra biológica en contacto con un tercer oligonucleótido que se hibrida con un tercer polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6 e ID. SEC. n° 7, o su complemento; y

- (f) poner dicha muestra biológica en contacto con un cuarto oligonucleótido que se hibrida con un cuarto polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 13, ID. SEC. n° 15, ID. SEC. n° 17, ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23 e ID. SEC. n° 24, o su complemento;

en el que la operación (c) comprende detectar en dicha muestra biológica una cantidad del oligonucleótido hibridado de las operaciones (a), (b), (e) y (f).

Alternativamente, el método comprende además:

- (e) poner dicha muestra biológica en contacto con un tercer oligonucleótido que se hibrida con un tercer polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 3, ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6 e ID. SEC. n° 7, o su complemento;

- (f) poner dicha muestra biológica en contacto con un cuarto oligonucleótido que se hibrida con un cuarto polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en el polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 11, o su complemento;

- (g) poner dicha muestra biológica en contacto con un quinto oligonucleótido que se hibrida con un quinto polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en las ID. SEC. números 13, 15 y 17, o su complemento;

- (h) poner dicha muestra biológica en contacto con un sexto oligonucleótido que se hibrida con un sexto polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23 e ID. SEC. n° 24, o su complemento;

- (i) poner dicha muestra biológica en contacto con un séptimo oligonucleótido que se hibrida con un séptimo polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 30 o su complemento;

- (j) poner dicha muestra biológica en contacto con un octavo oligonucleótido que se hibrida con un octavo polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 32 o su complemento; y

- (k) poner dicha muestra biológica en contacto con un noveno oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 76 o su complemento;

en el que la operación (c) comprende detectar en dicha muestra biológica una cantidad del oligonucleótido hibridado de las operaciones (a), (b), (e), (f), (g), (h), (i), (j) y (k).

En un segundo aspecto del presente invento, se proporciona un método para detectar la presencia de una célula de cáncer de mama, método que comprende las operaciones de:

- (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con una primera pareja de oligonucleótidos, primera pareja que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido, en el que dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido se hibridan con un primer polinucleótido y

con su complemento, respectivamente, y en el que dicho primer polinucleótido comprende mamaglobina o lipofilina B;

(b) poner dicha muestra biológica en contacto con una segunda pareja de oligonucleótidos, segunda pareja que comprende un tercer oligonucleótido y un cuarto oligonucleótidos, en el que dichos oligonucleótidos tercero y cuarto se hibridan con un segundo polinucleótido y con su complemento, respectivamente, y en el que dicho segundo polinucleótido comprende GABA $\pi$  (B899P);

(c) multiplicar dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido; y

(d) detectar dicho primer polinucleótido multiplicado y dicho segundo polinucleótido multiplicado;

en el que la presencia de dicho primer polinucleótido multiplicado o dicho segundo polinucleótido multiplicado indica la presencia de una célula de cáncer de mama en dicho paciente.

Preferiblemente, dicho primer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 73, ID. SEC. n° 74 e ID. SEC. n° 76, y dicho segundo polinucleótido comprende el polinucleótido expuesto en la ID. SEC. n° 75. Ventajosamente, el método comprende además poner dicha muestra biológica en contacto con una tercera pareja de oligonucleótidos, tercera pareja que comprende un cebador directo y un cebador inverso que se hibridan con un tercer polinucleótido y su complemento, respectivamente, tercer polinucleótido que es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6 e ID. SEC. n° 7; en el que la operación (d) comprende además multiplicar dicho tercer polinucleótido y en el que la operación (e) comprende además detectar dicho tercer polinucleótido. Más preferiblemente, el método comprende además poner dicha muestra biológica en contacto con una cuarta pareja de oligonucleótidos, cuarta pareja que comprende un cebador directo y un cebador inverso que se hibridan con un cuarto polinucleótido y su complemento, respectivamente, cuarto polinucleótido que es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 13, ID. SEC. n° 15, ID. SEC. n° 17, ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23 e ID. SEC. n° 24; en el que la operación (d) comprende además multiplicar dicho cuarto polinucleótido y en el que la operación (e) comprende además detectar dicho cuarto polinucleótido.

Más preferiblemente, dichos oligonucleótidos son seleccionados del grupo que consiste en los oligonucleótidos representados en las ID. SEC. números 33-38, 48-51 y 53-62.

Ventajosamente, la operación (e) comprende una operación seleccionada del grupo que consiste en detectar un radiomarcador y detectar un fluoróforo.

Preferiblemente, dichos oligonucleótidos son oligonucleótidos que abarcan intrones.

Ventajosamente, dichos oligonucleótidos que abarcan intrones son seleccionados del grupo que consiste en los oligonucleótidos representados en las ID. SEC. números 36-44 y 48-62.

Más preferiblemente, la detección de dicho polinucleótido primero, segundo, tercero o cuarto multiplicado comprende poner dicho polinucleótido primero, segundo, tercero o cuarto multiplicado en contacto con una sonda oligonucleotídica marcada que se hibrida, bajo condiciones moderadamente rigurosas, con dicho polinucleótido primero, segundo, tercero o cuarto. Preferiblemente, dicha sonda oligonucleotídica marcada comprende un resto detectable seleccionado del grupo que consiste en un radiomarcador y un fluoróforo.

Preferiblemente, la citada operación de multiplicación es llevada a cabo mediante una metodología de multiplicación de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR; del inglés, reverse transcription polymerase chain reaction), PCR inversa, multiplicación rápida de extremos de cDNA (RACE; del inglés, rapid amplification of cDNA ends), reacción en cadena de la ligasa (LCR; del inglés, ligase chain reaction), replicasa de Qbeta, multiplicación isotérmica, multiplicación por desplazamiento de cadenas (SDA; del inglés, strand displacement amplification), reacción en cadena rodante (RCR; del inglés, rolling chain reaction), reacción cíclica de sondas (CPR; del inglés, cyclic probe reaction), sistemas de multiplicación basados en transcripción (TAS; del inglés, transcription-based amplification systems), multiplicación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA; del inglés, nucleic acid sequence based amplification), y replicación automantenida de secuencias (3SR).

Preferiblemente, los métodos del presente invento comprenden además una operación de enriquecimiento de dicha muestra biológica en cuanto a dicha célula cancerosa antes de la hibridación de dicho(s) cebador(es) oligonucleotídico(s). Más preferiblemente, dicha operación de enriquecimiento de dicha muestra biológica en cuanto a dicha célula cancerosa es llevada a cabo mediante una metodología seleccionada del grupo que consiste en captura celular y agotamiento celular. Ventajosamente, la captura celular es llevada a cabo por inmunocaptura, inmunocaptura que comprende las operaciones de:

(a) hacer que un anticuerpo se adsorba a la superficie de dichas células cancerosas; y

- (b) separar dichas células cancerosas con anticuerpo adsorbido, del resto de dicha muestra biológica. Preferiblemente, dicho anticuerpo se dirige hacia un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD29, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD66B, CD66e, HLA-DR, IgE y TCR $\alpha\beta$ , o es un anticuerpo dirigido hacia un antígeno tumoral de mama.

Más preferiblemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Ventajosamente, el citado anticuerpo está conjugado con glóbulos magnéticos o está formulado en un complejo de anticuerpo tetrámero.

Preferiblemente, el agotamiento celular es llevado a cabo mediante un método que comprende las operaciones de:

- (a) entrecruzar glóbulos rojos y glóbulos blancos; y  
(b) fraccionar dichos glóbulos rojos y blancos entrecruzados del resto de dicha muestra biológica.

Ventajosamente, en los métodos del presente invento, dicha muestra biológica es seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero, ganglio linfático, médula ósea, esputo, orina y muestra de biopsia tumoral. Preferiblemente, dicha muestra biológica es seleccionada del grupo que consiste en sangre, un ganglio linfático y médula ósea. Más preferiblemente, dicho ganglio linfático es un ganglio linfático centinela.

Más preferiblemente, en los métodos del presente invento, dicha operación de detección comprende una operación de fraccionamiento.

En un aspecto más del presente invento, se proporciona una composición para detectar una célula de cáncer de mama en una muestra biológica de un paciente, composición que comprende:

- (a) un primer oligonucleótido; y  
(b) un segundo oligonucleótido;

en la que dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido tienen una longitud de al menos 15 nucleótidos y se hibridan específicamente con un primer polinucleótido o su complemento y con un segundo polinucleótido o su complemento, respectivamente; en la que dicho primer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en la ID. SEC. nº 73, ID. SEC. nº 74 e ID. SEC. nº 76; y en la que dicho segundo polinucleótido comprende el polinucleótido expuesto en la ID. SEC. nº 75.

Preferiblemente, la composición comprende además un tercer y un cuarto oligonucleótidos, tercer y cuarto oligonucleótidos que se hibridan con un tercer polinucleótido o su complemento y con un cuarto polinucleótido o su complemento, respectivamente; en que dicho tercer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6 e ID. SEC. nº 7; y en que dicho cuarto polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 13, ID. SEC. nº 15, ID. SEC. nº 17, ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23 e ID. SEC. nº 24.

Más preferiblemente, dichos oligonucleótidos son seleccionados del grupo que consiste en oligonucleótidos como los descritos en las ID. SEC. números 33-44, 48-62, y 72.

En otro aspecto del presente invento, se proporciona una composición para detectar una célula de cáncer de mama en una muestra biológica de un paciente, composición que comprende:

- (a) una primera pareja de oligonucleótidos; y  
(b) una segunda pareja de oligonucleótidos;

en que dicha primera pareja de oligonucleótidos y dicha segunda pareja de oligonucleótidos tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos y se hibridan específicamente con un primer polinucleótido o su complemento y con un segundo polinucleótido o su complemento, respectivamente; en que dicho primer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en la ID. SEC. nº 73, ID. SEC. nº 74 e ID. SEC. nº 76; y en que dicho segundo polinucleótido comprende el polinucleótido expuesto en la ID. SEC. nº 75.

Preferiblemente, la composición comprende además una tercera pareja de oligonucleótidos y una cuarta pareja de oligonucleótidos, tercera pareja de oligonucleótidos y cuarta pareja de oligonucleótidos que se hibridan con un tercer polinucleótido o su complemento y con un cuarto polinucleótido o su complemento, respectivamente; en que dicho tercer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6 e ID. SEC. nº 7; y en que dicho cuarto polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 13, ID. SEC. nº 15, ID. SEC. nº 17, ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23 e ID. SEC. nº 24.

Ventajosamente, dichos oligonucleótidos son seleccionados del grupo que consiste en oligonucleótidos como los descritos en las ID. SEC. números 33-44, 48-62, y 72.

5 También se proporciona un sistema para la detección del cáncer de mama, que incluye las composiciones del presente invento.

La descripción presente proporciona métodos para identificar uno o más polinucleótidos tisularmente específicos, métodos que comprenden las operaciones de: (a) llevar a cabo una sustracción genética para identificar una colección de polinucleótidos procedentes de un tejido de interés; (b) llevar a cabo un análisis, mediante micromatrices de  
10 DNA, para identificar un primer subconjunto de dicha colección de polinucleótidos de interés, en que cada miembro polinucleotídico de dicho primer subconjunto está sobreexpresado al menos al doble en dicho tejido de interés en comparación con un tejido testigo; y (c) llevar a cabo un análisis cuantitativo, por reacción en cadena de la polimerasa, sobre polinucleótidos de dicho primer subconjunto para identificar un segundo subconjunto de polinucleótidos que están sobreexpresados al menos al doble en comparación con el tejido testigo. Las sustracciones genéticas preferidas  
15 son seleccionadas del grupo que consiste en representación diferencial y sustracción de cDNA y son descritas con mayor detalle más adelante.

La descripción presente proporciona métodos para identificar un subconjunto de polinucleótidos que muestran perfiles de expresión tisularmente específicos concordantes y/o complementarios en un tejido de interés. Dichos métodos comprenden las operaciones de: (a) llevar a cabo un análisis de expresión seleccionado del grupo que consiste en micromatriz de DNA y PCR cuantitativa, para identificar un primer polinucleótido que está sobreexpresado al menos al doble en un tejido de interés en comparación con un tejido testigo; y (b) llevar a cabo un análisis de expresión seleccionado del grupo que consiste en micromatriz de DNA y PCR cuantitativa, para identificar un primer polinucleótido que está sobreexpresado al menos al doble en un tejido de interés en comparación con un tejido testigo.  
25

Otras realizaciones de la presente descripción proporcionan métodos para detectar la presencia de una célula cancerosa en un paciente. Dichos métodos comprenden las operaciones de: (a) obtener una muestra biológica del paciente; (b) poner la muestra biológica en contacto con una primera pareja de oligonucleótidos cuyos miembros se hibridan, bajo condiciones moderadamente rigurosas, con un primer polinucleótido y su complemento, respectivamente; (c)  
30 poner la muestra biológica en contacto con una segunda pareja de oligonucleótidos cuyos miembros se hibridan, bajo condiciones moderadamente rigurosas, con un segundo polinucleótido y su complemento, respectivamente; primer polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que no está relacionada con la del segundo polinucleótido; (d) multiplicar el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido; y (e) detectar el primer polinucleótido multiplicado y el segundo polinucleótido multiplicado; en los que la presencia del primer polinucleótido multiplicado o del segundo polinucleótido multiplicado indica la presencia de una célula cancerosa en el paciente.  
35

En algunas realizaciones, la detección de los polinucleótidos primero y/o segundo multiplicados puede ir precedida de una operación de fraccionamiento tal como, por ejemplo, una electroforesis en gel. Alternativa o adicionalmente, la detección de los polinucleótidos primero y/o segundo multiplicados puede ser llevada a cabo mediante la hibridación de una sonda oligonucleotídica marcada que se hibrida específicamente, bajo condiciones moderadamente rigurosas, con el polinucleótido primero o segundo. La marcación de oligonucleótidos puede ser llevada a cabo al incorporar un nucleótido radiomarcado o al incorporar un marcador fluorescente.  
40

En ciertas realizaciones preferidas, la muestra biológica puede ser enriquecida en células de un tipo tisular específico antes de las operaciones de detección. El enriquecimiento puede ser llevado a cabo mediante una metodología seleccionada del grupo que consiste en captura celular y agotamiento celular. Los métodos de captura celular ejemplares incluyen la inmunocaptura y comprenden las operaciones de: (a) hacer que un anticuerpo se adsorba a la superficie de células tisularmente específicas de dicha muestra biológica; y (b) separar las células tisularmente específicas con anticuerpo adsorbido, del resto de la muestra biológica. Se puede llevar a cabo un agotamiento celular ejemplar mediante el entrecruzamiento de glóbulos rojos y glóbulos blancos, seguido de una subsiguiente operación de fraccionamiento para separar las células entrecruzadas.  
50

Realizaciones alternativas de la presente descripción proporcionan métodos para determinar la presencia o ausencia de un cáncer en un paciente, que comprenden las operaciones de: (a) poner una muestra biológica, obtenida del paciente, en contacto con un oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama; (b) detectar en la muestra un nivel de un polinucleótido (tal como, por ejemplo, mRNA) que se hibrida con el oligonucleótido; y (c) comparar con un valor de corte predeterminado el nivel de polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer en el paciente. En ciertas realizaciones, la cantidad de mRNA es detectada mediante una reacción en cadena de la polimerasa utilizando, por ejemplo, al menos un cebador oligonucleotídico que se hibrida con un polinucleótido que codifica un polipéptido como el anteriormente indicado, o con un complemento de dicho polinucleótido. En otras realizaciones, la cantidad de mRNA es detectada utilizando una técnica de hibridación, empleando una sonda oligonucleotídica que se hibrida con un polinucleótido que codifica un polipéptido como el anteriormente indicado, o con un complemento de dicho polinucleótido.  
65

En aspectos relacionados, se describen métodos para controlar el progreso de un cáncer en un paciente, que comprenden las operaciones de: (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con un oligonu-

cleótido que se hibrida con un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama; (b) detectar en la muestra una cantidad de un polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido; (c) repetir las operaciones (a) y (b) usando una muestra biológica obtenida del paciente en un momento posterior; y (d) comparar la cantidad del polinucleótido detectado en la operación (c) con la cantidad detectada en la operación (b) y controlar, a partir de la comparación, el progreso del cáncer en el paciente.

Ciertas realizaciones de la presente descripción prevén que la operación de multiplicación de dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido se lleve a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En ciertas realizaciones, la célula cancerosa que se va a detectar puede ser seleccionada del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, leucemia, melanoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer endometrial. Aún otras realizaciones del presente invento prevén que la muestra biológica sea seleccionada del grupo que consiste en sangre, un ganglio linfático y médula ósea. El ganglio linfático puede ser un ganglio linfático centinela.

En realizaciones específicas de la presente descripción, se prevé que el primer polinucleótido sea seleccionado del grupo que consiste en mamaglobina, lipofilina B, GABA $\pi$  (B899P), B726P, B511S, B533S, B305D y B311D. En otras realizaciones se prevé que el segundo polinucleótido sea seleccionado del grupo que consiste en mamaglobina, lipofilina B, GABA $\pi$  (B899P), B726P, B511S, B533S, B305D y B311D.

Realizaciones alternativas del presente invento proporcionan métodos para detectar la presencia o ausencia de un cáncer en un paciente, que comprenden las operaciones de: (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con un primer oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en mamaglobina y lipofilina B; (b) poner la muestra biológica en contacto con un segundo oligonucleótido que se hibrida con una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo que consiste en GABA $\pi$  (B899P); (c) detectar en la muestra una cantidad de un polinucleótido que se hibrida con al menos uno de los oligonucleótidos; y (d) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad de polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer en el paciente.

De acuerdo con ciertas realizaciones, los oligonucleótidos pueden ser seleccionados entre los aquí descritos, tales como los presentados en las ID. SEC. números 33-72. En otras realizaciones, la cantidad de polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido es determinada utilizando una reacción en cadena de la polimerasa. Alternativamente, la cantidad de polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido puede ser determinada utilizando un ensayo de hibridación.

Aún otras realizaciones del presente invento proporcionan métodos para determinar la presencia o ausencia de una célula cancerosa en un paciente, que comprenden las operaciones de: (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con un primer oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 73 e ID. SEC. n° 74, o su complemento; (b) poner la muestra biológica en contacto con un segundo oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 75 o su complemento; (c) poner la muestra biológica en contacto con un tercer oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 3, ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6 e ID. SEC. n° 7, o su complemento; (d) poner la muestra biológica en contacto con un cuarto oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en el polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 11 o su complemento; (e) poner la muestra biológica en contacto con un quinto oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en las ID. SEC. números 13, 15 y 17, o su complemento; (f) poner la muestra biológica en contacto con un sexto oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23 e ID. SEC. n° 24, o su complemento; (g) poner la muestra biológica en contacto con un séptimo oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 30 o su complemento; (h) poner la muestra biológica en contacto con un octavo oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 32 o su complemento; (i) poner la muestra biológica en contacto con un noveno oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido representado en la ID. SEC. n° 76 o su complemento; (j) detectar en la muestra un oligonucleótido hibridado de cualquiera de las operaciones (a) a (i); y (j) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad de polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido, en que la presencia de un oligonucleótido hibridado en cualquiera de las operaciones (a) a (i) en una cantidad superior al valor de corte predeterminado indica la presencia de una célula cancerosa en la muestra biológica de dicho paciente.

Otras realizaciones relacionadas del presente invento proporcionan métodos para determinar la presencia o ausencia de una célula cancerosa en un paciente, que comprenden las operaciones de: (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido, en que dichos oligonucleótidos primero y segundo se hibridan bajo condiciones moderadamente rigurosas con unos polinucleótidos primero y segundo seleccionados del grupo que consiste en la ID. SEC. n° 73, ID. SEC. n° 74, ID. SEC. n° 75, ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 3, ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6, ID. SEC. n° 7, ID. SEC. n° 11, ID. SEC. n° 13, ID. SEC. n° 15, ID. SEC. n° 17, ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23, ID. SEC. n° 24, ID. SEC. n° 30, ID. SEC. n° 32 e ID. SEC. n° 76, y en que dicho primer polinucleótido no está estructuralmente

relacionado con dicho segundo polinucleótido; (b) detectar en la muestra dichos oligonucleótidos primero y segundo hibridados; y (c) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad de polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido, en que la presencia de un primer oligonucleótido hibridado o un segundo oligonucleótido hibridado en una cantidad superior al valor de corte predeterminado indica la presencia de una célula cancerosa en la muestra biológica de dicho paciente.

Otras realizaciones relacionadas de la descripción presente proporcionan métodos para determinar la presencia o ausencia de una célula cancerosa en un paciente, que comprenden las operaciones de: (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido, en que dichos oligonucleótidos primero y segundo se hibridan bajo condiciones moderadamente rigurosas con unos polinucleótidos primero y segundo que son dos polinucleótidos tisularmente específicos del cáncer que se va a detectar, y en que dicho primer polinucleótido no está estructuralmente relacionado con dicho segundo polinucleótido; (b) detectar en la muestra dichos oligonucleótidos primero y segundo hibridados; y (c) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad de polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido, en que la presencia de un primer oligonucleótido hibridado o un segundo oligonucleótido hibridado en una cantidad superior al valor de corte predeterminado indica la presencia de una célula cancerosa en la muestra biológica de dicho paciente.

En otros aspectos relacionados, el presente invento proporciona además composiciones útiles en los métodos aquí descritos. Las composiciones ejemplares comprenden dos o más pares de cebadores oligonucleotídicos, cada uno de los cuales se hibrida específicamente con un polinucleótido distinto. Los cebadores oligonucleotídicos ejemplares adecuados para las composiciones del presente invento son aquí descritos mediante las ID. SEC. números 33-71. Los polinucleótidos ejemplares adecuados para las composiciones del presente invento se describen en la ID. SEC. nº 73, ID. SEC. nº 74, ID. SEC. nº 75, ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 3, ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6, ID. SEC. nº 7, ID. SEC. nº 11, ID. SEC. nº 13, ID. SEC. nº 15, ID. SEC. nº 17, ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23, ID. SEC. nº 24, ID. SEC. nº 30, ID. SEC. nº 32 e ID. SEC. nº 76.

El presente invento también proporciona sistemas que son adecuados para llevar a cabo los métodos de detección del presente invento. Los sistemas ejemplares comprenden pares de cebadores oligonucleotídicos, cada uno de los cuales se hibrida específicamente con un polinucleótido distinto. En ciertas realizaciones, los sistemas acordes con el presente invento pueden también comprender una ácido nucleico polimerasa y un tampón adecuado. Los cebadores oligonucleotídicos ejemplares adecuados para los sistemas del presente invento se describen aquí mediante las ID. SEC. números 33-71. Los polinucleótidos ejemplares adecuados para los sistemas del presente invento se describen en la ID. SEC. nº 73, ID. SEC. nº 74, ID. SEC. nº 75, ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 3, ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6, ID. SEC. nº 7, ID. SEC. nº 11, ID. SEC. nº 13, ID. SEC. nº 15, ID. SEC. nº 17, ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23, ID. SEC. nº 24, ID. SEC. nº 30, ID. SEC. nº 32 e ID. SEC. nº 76.

Estos y otros aspectos del presente invento se harán evidentes por referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

#### 40 Breve descripción de los dibujos y los identificadores de secuencia

La Figura 1 muestra los perfiles de expresión de mRNA para B311D, B533S y B726P, según se determinan usando una PCR cuantitativa (Taqman™). Abreviaturas: B.T. ("Breast Tumor"); tumor de mama; B.M. ("Bone Marrow"); médula ósea; B.R. ("Breast Reduction"); reducción de mama.

La Figura 2 muestra la relación de la expresión de B533S con la fase patológica del tumor. Se analizaron, mediante PCR en tiempo real, tejidos de mama normal (8), trastornos benignos de mama (3), y fase I (5), fase II (6), fase III (7), fase IV (3) y metástasis (1 ganglio linfático y 3 efusiones pleurales) de tumores de mama. Los datos se expresan como copias medias/ng de  $\beta$ -actina para cada grupo analizado, y la línea es la línea de tendencia calculada.

Las Figuras 3A y 3B muestran la complementación génica de B305D (forma C), B726P, GABA $\pi$  y mamaglobina en metástasis y tumores primarios, respectivamente. Los cortes para cada uno de los genes fueron 6,57, 1,65, 4,58 y 3,56 copias/ng de  $\beta$ -actina basándose en la media de los tejidos normales negativos más 3 desviaciones estándares.

La Figura 4 muestra la secuencia de cDNA de longitud completa para la mamaglobina.

La Figura 5 muestra la determinada secuencia de cDNA del marco de lectura abierto que codifica un polipéptido recombinante de mamaglobina expresado en *E. coli*.

La Figura 6 muestra la secuencia de cDNA de longitud completa para GABA $\pi$ .

La Figura 7 muestra los niveles de expresión de mRNA para mamaglobina, GABA $\pi$ , B305D (forma C) y B726P en muestras normales y de tumor de mama, determinados usando una PCR en tiempo real y el sistema de detección SYBR. Abreviaturas: BT: tumor de mama; BR: reducción de mama; A. PBMC ("Activated peripheral blood mononuclear cells"); células mononucleares de sangre periférica activadas; R. PBMC: PBMC en reposo; T. Gland ("thyroid gland"); glándula tiroides; S. Cord ("spinal cord"); médula espinal; A. Gland ("adrenal gland"); glándula suprarrenal; B. Marrow: médula ósea; S. Muscle ("skeletal muscle"); músculo esquelético.



## ES 2 281 416 T3

La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra una comparación entre los ensayos múltiples para lípofilina B sola y para lipofilina B-B899P-B305D-C-B726P, realizados sobre un grupo de muestras de tumor de mama. Abreviaturas: BT: tumor de mama; BR: reducción de mama; SCID (“severe combined immunodeficiency”): inmunodeficiencia combinada grave.

La Figura 9 es un gel que muestra la longitud de banda única de cuatro productos de multiplicación de genes tumorales de interés (mamaglobina, B305D, B899P, B726P), analizada mediante un ensayo de PCR múltiple en tiempo real.

La Figura 10 muestra una comparación de un ensayo múltiple en que se usan cebadores que abarcan zonas límite intrón-exón (grupo inferior) y en que se usan cebadores no optimizados (grupo superior), para detectar células de cáncer de mama en un grupo de tejidos de ganglio linfático.

La ID. SEC. nº 1 es la determinada secuencia de cDNA para una primera variante de corte y empalme de la isoforma A de B305D.

La ID. SEC. nº 2 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ID. SEC. nº 1.

La ID. SEC. nº 3 es la determinada secuencia de cDNA para una segunda variante de corte y empalme de la isoforma A de B305D.

La ID. SEC. nº 4 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ID. SEC. nº 3.

Las ID. SEC. números 5-7 son las determinadas secuencias de cDNA para tres variantes de corte y empalme de la isoforma C de B305D.

Las ID. SEC. números 8-10 son las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ID. SEC. números 5-7, respectivamente.

La ID. SEC. nº 11 es la determinada secuencia de cDNA para B311D.

La ID. SEC. nº 12 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ID. SEC. nº 11.

La ID. SEC. nº 13 es la determinada secuencia de cDNA de una primera variante de corte y empalme de B726P.

La ID. SEC. nº 14 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ID. SEC. nº 13.

La ID. SEC. nº 15 es la determinada secuencia de cDNA de una segunda variante de corte y empalme de B726P.

La ID. SEC. nº 16 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ID. SEC. nº 15.

La ID. SEC. nº 17 es la determinada secuencia de cDNA de una tercera variante de corte y empalme de B726P.

La ID. SEC. nº 18 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ID. SEC. nº 17.

Las ID. SEC. números 19-24 son las determinadas secuencias de cDNA de otras variantes de corte y empalme de B726P.

Las ID. SEC. números 25-29 son las secuencias de aminoácidos codificadas por las ID. SEC. números 19-24, respectivamente.

La ID. SEC. nº 30 es la determinada secuencia de cDNA para B511S.

La ID. SEC. nº 31 es la secuencia de aminoácidos codificada por la ID. SEC. nº 30.

La ID. SEC. nº 32 es la determinada secuencia de cDNA para B533S.

La ID. SEC. nº 33 es la secuencia de DNA del cebador directo de lipofilina B.

La ID. SEC. nº 34 es la secuencia de DNA del cebador inverso de lipofilina B.

La ID. SEC. nº 35 es la secuencia de DNA de la sonda para lipofilina B.

La ID. SEC. nº 36 es la secuencia de DNA del cebador directo de GABA (B899P).

La ID. SEC. nº 37 es la secuencia de DNA del cebador inverso de GABA (B899P).

La ID. SEC. nº 38 es la secuencia de DNA de la sonda para GABA (B899P).

## ES 2 281 416 T3

La ID. SEC. nº 39 es la secuencia de DNA del cebador directo de B305D (forma C).

La ID. SEC. nº 40 es la secuencia de DNA del cebador inverso de B305D (forma C).

5 La ID. SEC. nº 41 es la secuencia de DNA de la sonda para B305D (forma C).

La ID. SEC. nº 42 es la secuencia de DNA del cebador directo de B726P.

La ID. SEC. nº 43 es la secuencia de DNA del cebador inverso de B726P.

10 La ID. SEC. nº 44 es la secuencia de DNA de la sonda para B726P.

La ID. SEC. nº 45 es la secuencia de DNA del cebador directo de actina.

15 La ID. SEC. nº 46 es la secuencia de DNA del cebador inverso de actina.

La ID. SEC. nº 47 es la secuencia de DNA de la sonda para actina.

La ID. SEC. nº 48 es la secuencia de DNA del cebador directo de mamaglobina.

20 La ID. SEC. nº 49 es la secuencia de DNA del cebador inverso de mamaglobina.

La ID. SEC. nº 50 es la secuencia de DNA de la sonda para mamaglobina.

25 La ID. SEC. nº 51 es la secuencia de DNA de un segundo cebador inverso de GABA (B899P).

La ID. SEC. nº 52 es la secuencia de DNA de un segundo cebador directo de B726P.

La ID. SEC. nº 53 es la secuencia de DNA de un cebador directo de GABA B899P-INT.

30 La ID. SEC. nº 54 es la secuencia de DNA de un cebador inverso de GABA B899P-INT.

La ID. SEC. nº 55 es la secuencia de DNA de una sonda Taqman para GABA B899P-INT.

35 La ID. SEC. nº 56 es la secuencia de DNA de un cebador directo de B305D-INT.

La ID. SEC. nº 57 es la secuencia de DNA de un cebador inverso de B305D-INT.

La ID. SEC. nº 58 es la secuencia de DNA de una sonda Taqman para B305D-INT.

40 La ID. SEC. nº 59 es la secuencia de DNA de un cebador directo de B726-INT.

La ID. SEC. nº 60 es la secuencia de DNA de un cebador inverso de B726-INT.

45 La ID. SEC. nº 61 es la secuencia de DNA de una sonda Taqman para B726-INT.

La ID. SEC. nº 62 es la secuencia de DNA de una sonda Taqman para GABA B899P.

La ID. SEC. nº 63 es la secuencia de DNA de un cebador directo de B311D.

50 La ID. SEC. nº 64 es la secuencia de DNA de un cebador inverso de B311D.

La ID. SEC. nº 65 es la secuencia de DNA de una sonda Taqman para B311D.

55 La ID. SEC. nº 66 es la secuencia de DNA de un cebador directo de B533S.

La ID. SEC. nº 67 es la secuencia de DNA de un cebador inverso de B533S.

La ID. SEC. nº 68 es la secuencia de DNA de una sonda Taqman para B533S.

60 La ID. SEC. nº 69 es la secuencia de DNA de un cebador directo de B511S.

La ID. SEC. nº 70 es la secuencia de DNA de un cebador inverso de B511S.

65 La ID. SEC. nº 71 es la secuencia de DNA de una sonda Taqman para B511S.

La ID. SEC. nº 72 es la secuencia de DNA de un cebador inverso de GABA $\pi$ .

La ID. SEC. nº 73 es la secuencia de cDNA de longitud completa para mamaglobina.

La ID. SEC. nº 74 es la determinada secuencia de cDNA del marco de lectura abierto que codifica un polipéptido recombinante de mamaglobina expresado en *E. coli*.

La ID. SEC. nº 75 es la secuencia de cDNA de longitud completa para GABA $\pi$ .

La ID. SEC. nº 76 es la secuencia de cDNA de longitud completa para lipofilina B.

La ID. SEC. nº 77 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ID. SEC. nº 76.

### Descripción detallada del invento

Como se indicó anteriormente, el presente invento se dirige, en general, a métodos que son adecuados para la identificación de polinucleótidos tisularmente específicos, así como a métodos, composiciones y sistemas que son adecuados para el diagnóstico y el control del cáncer de mama.

#### *Identificación de polinucleótidos tisularmente específicos*

Ciertas realizaciones del presente invento proporcionan métodos, composiciones y sistemas para la detección de una célula de cáncer de mama en una muestra biológica. Estos métodos comprenden la operación de detectar uno o más polinucleótidos tisularmente específicos en una muestra biológica de un paciente, la sobreexpresión de los cuales indica la presencia de una célula cancerosa en la muestra biológica del paciente. En consecuencia, el presente invento también proporciona métodos que son adecuados para la identificación de polinucleótidos tisularmente específicos. Con las frases “polinucleótidos tisularmente específicos” y “polinucleótidos tumoralmente específicos”, como se usan aquí, se quieren incluir todos los polinucleótidos que están sobreexpresados al menos al doble en comparación con uno o más tejidos testigo. Como se discute más adelante con mayor detalle, la sobreexpresión de un polinucleótido dado puede ser evaluada, por ejemplo, mediante metodologías de micromatriz y/o de reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-time PCR™).

Los métodos ejemplares para detectar polinucleótidos tisularmente específicos pueden comprender las operaciones de: (a) llevar a cabo una sustracción genética para identificar una colección de polinucleótidos procedentes de un tejido de interés; (b) llevar a cabo un análisis, mediante micromatrices de DNA, para identificar un primer subconjunto de dicha colección de polinucleótidos de interés, en que cada miembro polinucleotídico de dicho primer subconjunto está sobreexpresado al menos al doble en dicho tejido de interés en comparación con un tejido testigo; y (c) llevar a cabo un análisis, por reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa, sobre polinucleótidos de dicho primer subconjunto para identificar un segundo subconjunto de polinucleótidos que están sobreexpresados al menos al doble en comparación con dicho tejido testigo.

#### *Polinucleótidos en general*

Como se usa aquí, el término “polinucleótido” se refiere generalmente a moléculas de DNA o RNA. Los polinucleótidos pueden ser polinucleótidos presentes en la naturaleza, como los hallados normalmente en una muestra biológica tal como sangre, suero, ganglio linfático, médula ósea, esputo, orina y muestras de biopsias tumorales. Alternativamente, los polinucleótidos pueden ser obtenidos sintéticamente mediante, por ejemplo, una reacción de polimerización de ácido nucleico. Como será reconocido por el técnico experto, los polinucleótidos pueden ser de cadena sencilla (codificantes o antisentido) o de doble cadena, y pueden ser moléculas de DNA (genómico, cDNA o sintético) o de RNA. Las moléculas de RNA incluyen moléculas de HnRNA, que contienen intrones y corresponden a una molécula de DNA en un modo uno a uno, y moléculas de mRNA, que no contienen intrones. Pueden estar presentes, aunque no es necesario, secuencias codificantes o no codificantes adicionales en un polinucleótido del presente invento, y un polinucleótido puede estar unido, aunque no es necesario, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica una proteína tumoral, tal como una proteína de tumor de mama, o una porción de la misma) o pueden comprender una variante, o un equivalente biológico o antigénico funcional de dicha secuencia. Las variantes polinucleotídicas pueden contener una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, como se describe más adelante. El término “variantes” también abarca genes homólogos de origen xenogénico.

Cuando se comparan secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, se dice que dos secuencias son “idénticas” si las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de las dos secuencias son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia, como se describe más adelante. Las comparaciones entre dos secuencias son llevadas típicamente a cabo comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales con similitud de secuencia. Como se usa aquí, una “ventana de comparación” se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en la que una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez que las dos secuencias están óptimamente alineadas.

La alineación óptima de secuencias para comparación puede ser llevada a cabo utilizando el programa Megalign de la serie Lasergene de software para bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, EE.UU.), usando los parámetros predeterminados. Este programa incluye varios esquemas de alineación descritos en las referencias siguientes: M. O. Dayhoff (1978), "A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships", en *Atlas of Protein Sequence and Structure*, compilado por M. O. Dayhoff, National Biomedical Research Foundation, Washington, Distrito de Columbia, EE.UU., Volumen 5, Suplemento 3, páginas 345-358; J. Hein (1990), "Unified Approach to Alignment and Phylogenies", páginas 626-645, *Methods in Enzymology*, Volumen 183, Academic Press, Inc., San Diego, California, EE.UU.; D. G. Higgins y P. M. Sharp (1989), *CABIOS* 5: 151-153; E. W. Myers y W. Muller (1988), *CABIOS* 4: 11-17; E. D. Robinson (1971), *Comb. Theor.* 11: 105; N. Santou y M. Nes (1987), *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425; P. H. A. Sneath y R. R. Sokal (1973), *Numerical Taxonomy - The Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, California, EE.UU.; W. J. Wilbur y D. J. Lipman (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 726-730.

Alternativamente, la alineación óptima de secuencias para comparación puede ser llevada a cabo mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981), *Add APL. Math.* 2: 482, mediante el algoritmo de alineación de identidades de Needleman y Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48: 443, mediante la búsqueda de métodos de similitudes de Pearson y Lipman (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, mediante aplicaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU.), o mediante inspección.

Un ejemplo preferido de los algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que son descritos por Altschul *et al.* (1977), *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402, y Altschul *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, respectivamente. Se pueden utilizar BLAST y BLAST 2.0, por ejemplo, con los parámetros aquí descritos, para determinar el porcentaje de identidad de secuencias para los polinucleótidos y polipéptidos del invento. El software para llevar a cabo análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information. En un ejemplo ilustrativo, pueden calcularse puntuaciones acumuladas usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos equivalentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no equivalentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se puede usar una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada baja de su máximo valor alcanzado en la cantidad X; la puntuación acumulada llega a cero o menos a causa de la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) utiliza como parámetros predeterminados una longitud de palabra (W) de 11 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 [véase Henikoff y Henikoff (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10.915] usa alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencias" es determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en que la porción de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica de la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos, normalmente de 5 a 15 por ciento, o de 10 a 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones ni supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje es calculado determinando el número de posiciones en que se presentan bases de ácido nucleico idénticas o restos de aminoácido idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones equiparadas, dividiendo el número de posiciones equiparadas por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

Por lo tanto, el presente invento abarca secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas que tienen una identidad sustancial con respecto a las secuencias aquí descritas, por ejemplo, aquellas que comprenden al menos un 50% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia en comparación con una secuencia polinucleotídica o polipeptídica de este invento, al usar los métodos aquí descritos (por ejemplo, un análisis BLAST usando parámetros estándares, como se describe más adelante). Un experto en esta técnica reconocerá que estos valores pueden ser apropiadamente ajustados para determinar la correspondiente identidad de las proteínas codificadas por dos secuencias nucleotídicas, teniendo en cuenta la degeneración codónica, la similitud de aminoácidos, la posición de marcos de lectura, y similares.

En realizaciones adicionales, el presente invento proporciona polinucleótidos y polipéptidos aislados que comprenden diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idénticos a, o complementarios de, una o más de las secuencias aquí descritas. Por ejemplo, mediante este invento se proporcionan polinucleótidos que comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 ó 1000 o más nucleótidos contiguos de una o más de las secuencias aquí descritas, así como todas las longitudes intermedias entre ellas. Se entenderá fácilmente que, en este contexto, "longitudes intermedias" significa cualquier longitud entre los valores indicados, tal como 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros entre 200 y 500; entre 500 y 1000, y similares.

Los polinucleótidos del presente invento, o sus fragmentos, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de DNA, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios adicionales para enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, por lo que su longitud global puede variar considerablemente. Por lo tanto, se considera que puede emplearse un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, longitud total que está preferiblemente limitada por la facilidad de preparación y por el uso en el previsto protocolo de DNA recombinante. Por ejemplo, se considera que segmentos de DNA ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10.000, aproximadamente 5000, aproximadamente 3000, aproximadamente 2000, aproximadamente 1000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, o aproximadamente 50 pares de bases, y similares (incluyendo todas las longitudes intermedias), son útiles en muchas aplicaciones de este invento.

En otras realizaciones, el presente invento se dirige a polinucleótidos que son capaces de hibridarse bajo condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia polinucleotídica aquí proporcionada, o un fragmento de la misma, o una secuencia complementaria de la misma. Las técnicas de hibridación son bien conocidas en el campo de la biología molecular. Con fines de ilustración, las condiciones moderadamente rigurosas adecuadas para analizar la hibridación de un polinucleótido de este invento con otros polinucleótidos incluyen prelavado en una disolución de SSC 5X, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH de 8,0); hibridación a 50°C-65°C, SSC 5X, durante la noche; y luego lavado dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X que contienen SDS al 0,1%.

Además, quienes tienen una experiencia normal en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido como el aquí descrito. Algunos de estos polinucleótidos poseen una homología mínima con respecto a la secuencia nucleotídica de cualquier gen nativo. No obstante, el presente invento considera específicamente los polinucleótidos que varían a causa de diferencias en la utilización de codones. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas aquí proporcionadas están dentro del alcance del presente invento. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El mRNA y la proteína resultantes pueden tener, aunque no es necesario, una estructura o función alterada. Los alelos pueden ser identificados utilizando técnicas estándares (tales como hibridación, multiplicación y/o comparación de secuencias con bases de datos).

#### *Análisis en micromatriz*

Los polinucleótidos que son adecuados para detección de acuerdo con los métodos del presente invento pueden ser identificados, como se describe más adelante con mayor detalle, explorando una micromatriz de cDNAs en cuanto a la expresión tisular y/o tumoralmente asociada (por ejemplo, expresión que es al menos dos veces mayor en un tejido tumoral que en un tejido normal, según se determina utilizando un ensayo representativo aquí proporcionado). Dichas exploraciones pueden ser llevadas a cabo, por ejemplo, utilizando una micromatriz Synteni (Palo Alto, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante [y esencialmente del modo descrito por Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10.614-10.619 (1996), y Heller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2150-2155 (1997)].

La micromatriz es un método eficaz para evaluar grandes números de genes pero, a causa de su sensibilidad limitada, puede que no determine precisamente la distribución tisular absoluta de los genes de baja abundancia o puede que infraestime el grado de sobreexpresión de los genes más abundantes a causa de una saturación de la señal. Para los genes que presentaban sobreexpresión mediante la perfiladura de la expresión en micromatriz, se llevó a cabo un análisis adicional usando una transcripción inversa (RT; del inglés, *reverse transcription*)-PCR cuantitativa basada en detección con sondas Taqman™, que comprende un mayor intervalo dinámico de sensibilidades. Con este fin, se utilizaron varios grupos diferentes de tejidos normales y tumorales, metástasis distantes y líneas celulares.

#### *Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real*

Los polinucleótidos adecuados de acuerdo con el presente invento pueden ser adicionalmente caracterizados o, alternativamente, originalmente identificados empleando una metodología de PCR cuantitativa, tal como, por ejemplo, la metodología de PCR en tiempo real. Mediante esta metodología, muestras tisulares y/o tumorales, tales como, por ejemplo, muestras de tumores metastásicos, pueden ser analizadas junto a la correspondiente muestra de tejido normal y/o un grupo de muestras de tejidos normales no relacionados.

La PCR en tiempo real (véanse Gibson *et al.*, *Genome Research* 6: 995-1001, 1996; Heid *et al.*, *Genome Research* 6: 986-994, 1996) es una técnica que permite evaluar el nivel de acumulación de productos de PCR durante la multiplicación. Esta técnica permite la evaluación cuantitativa de niveles de mRNA en múltiples muestras. En resumen, se extrae mRNA del tejido tumoral y el normal y se prepara cDNA usando técnicas estándares.

La PCR en tiempo real puede ser llevada a cabo, por ejemplo, en un sistema para detección de secuencias ABI7700 Prism o GeneAmp® 5700 (PE Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). El sistema 7700 utiliza un cebador directo y un cebador inverso en combinación con una sonda específica que tiene un colorante informador fluorescente 5' en un extremo y un colorante sofocador 3' en el otro extremo (Taqman™). Cuando la PCR en tiempo real es llevada a cabo usando DNA polimerasa Taq con actividad nucleasa 5'-3', la sonda es escindida y comienza a emitir fluorescencia, lo que permite que la reacción sea controlada por el aumento de fluorescencia (tiempo real). El sistema 5700 utiliza SYBR® Green, un colorante fluorescente que sólo se une a DNA de doble cadena, y los mismos cebadores directo

e inverso que el instrumento 7700. Los cebadores de apareamiento y las sondas fluorescentes pueden diseñarse de acuerdo con el programa Primer Express (PE Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Las concentraciones óptimas de cebadores y sondas son inicialmente determinadas por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. Los cebadores y sondas testigo (por ejemplo,  $\beta$ -actina) pueden obtenerse comercialmente de, por ejemplo, Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, California, EE.UU.).

Para cuantificar la cantidad de RNA específico en una muestra, se genera una curva patrón utilizando un plásmido que contiene el gen de interés. Se generan curvas patrón utilizando los valores de Ct determinados en la PCR en tiempo real, que están relacionados con la concentración inicial de cDNA utilizada en el ensayo. Bastan generalmente diluciones de patrón que varíen de  $10^4$  a  $10^6$  copias del gen de interés. Además, se genera una curva patrón para la secuencia testigo. Esto permite la estandarización del contenido inicial de RNA de una muestra tisular con respecto a la cantidad en el testigo, con fines comparativos.

De acuerdo con lo anterior, y como se describe más adelante, el presente invento proporciona los ilustrativos polinucleótidos específicos de tumor y/o tejido de mama: mamaglobina, lipofilina B, GABA $\pi$  (B899P), B726P, B511S, B533S, B305D y B311D, que tienen las secuencias expuestas en las ID. SEC. números 1, 3, 5-7, 11, 13, 15, 17, 19-24, 30, 32 y 73-76, y los polipéptidos ilustrativos codificados por ellos, que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las ID. SEC. números 2, 4, 8-10, 12, 14, 16, 18, 25-29 y 31 y 77, que pueden emplearse adecuadamente en la detección del cáncer, más específicamente del cáncer de mama.

Los métodos aquí descritos también permitirán la identificación de polinucleótidos adicionales y/o alternativos que sean adecuados para la detección de una gran variedad de cánceres, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, leucemia, melanoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer endometrial.

#### *Metodologías para la detección del cáncer*

En general, se puede detectar una célula cancerosa en un paciente basándose en la presencia de uno o más polinucleótidos en células de una muestra biológica (por ejemplo, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, sueros, esputo, orina y o biopsias tumorales) obtenida del paciente. En otras palabras, dichos polinucleótidos pueden ser utilizados como marcadores para indicar la presencia o ausencia de un cáncer, tal como, por ejemplo, el cáncer de mama

Como aquí se discute con mayor detalle, el presente invento alcanza estos y otros objetivos relacionados al proporcionar una metodología para la detección simultánea de más de un polinucleótido, la presencia del cual es diagnóstica de la presencia de células cancerosas en una muestra biológica. Cada una de las diversas metodologías para detección de cáncer aquí descritas tienen en común una operación de hibridación de uno o más cebadores y/o sondas oligonucleotídicas, la hibridación de los cuales es demostrativa de la presencia de un polinucleótido tumoral y/o tisularmente específico. Dependiendo de la aplicación concreta considerada, puede preferirse emplear uno o más oligonucleótidos que abarcan intrones, que sean inoperantes frente a polinucleótidos de DNA genómico, y, por lo tanto, estos oligonucleótidos son eficaces para reducir y/o eliminar sustancialmente la detección de DNA genómico en la muestra biológica.

También se describen aquí métodos para potenciar la sensibilidad de estas metodologías de detección al someter las muestras biológicas que se van a analizar a una o más metodologías de captura celular y/o agotamiento celular.

En ciertas realizaciones del presente invento, la presencia de una célula cancerosa en un paciente puede ser determinada empleando las operaciones siguientes: (a) obtener una muestra biológica de dicho paciente; (b) poner dicha muestra biológica en contacto con un primer oligonucleótido que se hibrida con un primer polinucleótido, primer polinucleótido que es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 73 e ID. SEC. n° 74; (c) poner dicha muestra biológica en contacto con un segundo oligonucleótido que se hibrida con un segundo polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 1, 3, 5-7, 11, 13, 15, 17, 19-24, 30, 32 y 75; (d) detectar en dicha muestra una cantidad de un polinucleótido que se hibrida con al menos uno de los oligonucleótidos; y (e) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad del polinucleótido que se hibrida con dicho oligonucleótido y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer en el paciente.

Realizaciones alternativas del presente invento proporcionan métodos mediante los cuales se determina la presencia de una célula cancerosa en un paciente, empleando las operaciones de: (a) obtener una muestra biológica de dicho paciente; (b) poner dicha muestra biológica en contacto con un primer oligonucleótido que se hibrida con un primer polinucleótido, primer polinucleótido que se representa en la ID. SEC. n° 76; (c) poner dicha muestra biológica en contacto con un segundo oligonucleótido que se hibrida con un segundo polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 1, 3, 5-7, 11, 13, 15, 17, 19-24, 30, 32 y 75; (d) detectar en dicha muestra una cantidad de un polinucleótido que se hibrida con al menos uno de los oligonucleótidos; y (e) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad del polinucleótido que se hibrida con dicho oligonucleótido y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer en el paciente.

Otras realizaciones del presente invento proporcionan métodos para determinar la presencia o ausencia de un cáncer en un paciente. Dichos métodos comprenden las operaciones de: (a) obtener una muestra biológica de dicho

paciente; (b) poner dicha muestra biológica obtenida del paciente en contacto con un primer oligonucleótido que se hibrida con una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 73, ID. SEC. nº 74 e ID. SEC. nº 76; (c) poner dicha muestra biológica en contacto con un segundo oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido como el representado en la ID. SEC. nº 75; (d) poner dicha muestra biológica en contacto con un tercer oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6 e ID. SEC. nº 7; (e) poner dicha muestra biológica en contacto con un cuarto oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 13, ID. SEC. nº 15, ID. SEC. nº 17, ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23 e ID. SEC. nº 24; (f) detectar en dicha muestra biológica una cantidad de un polinucleótido que se hibrida con al menos uno de dichos oligonucleótidos; y (g) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad del polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer en el paciente.

Para permitir la hibridación bajo las condiciones de ensayo, los cebadores y sondas oligonucleotídicas deberían comprender una secuencia oligonucleotídica que tuviera al menos aproximadamente 60%, preferiblemente al menos aproximadamente 75%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, de identidad con respecto a una porción de un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama y que tiene al menos 10 nucleótidos, y preferiblemente al menos 20 nucleótidos, de longitud. Preferiblemente, los cebadores oligonucleotídicos se hibridan bajo condiciones moderadamente rigurosas con un polinucleótido que codifica un polipéptido aquí descrito, como se definió anteriormente. Los cebadores oligonucleotídicos que pueden ser útilmente empleados en los métodos diagnósticos aquí descritos tienen preferiblemente una longitud de al menos 10-40 nucleótidos. En una realización preferida, los cebadores oligonucleotídicos comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos, más preferiblemente al menos 15 nucleótidos contiguos, de una molécula de DNA que tiene una secuencia expuesta en las ID. SEC. números 1, 3, 5-7, 11, 13, 15, 17, 19-24, 30, 32 y 73-76. Las técnicas tanto para ensayos basados en PCR como para ensayos de hibridación son bien conocidas en este campo técnico (véanse, por ejemplo, Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263, 1987; *PCR Technology*, compilado por Erlich, Stockton Press, New York, EE.UU., 1989).

El presente invento también proporciona métodos basados en multiplicación, para detectar la presencia de una célula cancerosa en un paciente. Los métodos ejemplares comprenden las operaciones de (a) obtener una muestra biológica de un paciente; (b) poner la muestra biológica en contacto con una primera pareja de oligonucleótidos, primera pareja que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido, en que el primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido se hibridan con un primer polinucleótido y su complemento, respectivamente; (c) poner la muestra biológica en contacto con una segunda pareja de oligonucleótidos, segunda pareja que comprende un tercer oligonucleótido y un cuarto oligonucleótido, en que los oligonucleótidos tercero y cuarto se hibridan con un segundo polinucleótido y su complemento, respectivamente, y en que el primer polinucleótido tiene una secuencia nucleotídica que no está relacionada con la del segundo polinucleótido; (d) multiplicar el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido; y (e) detectar el primer polinucleótido multiplicado y el segundo polinucleótido multiplicado; en los que la presencia del primer polinucleótido multiplicado o del segundo polinucleótido multiplicado indica la presencia de una célula cancerosa en el paciente.

Los métodos de acuerdo con el presente invento son adecuados para identificar polinucleótidos obtenidos de una gran variedad de muestras biológicas, tales como, por ejemplo, sangre, suero, ganglio linfático, médula ósea, esputo, orina y muestra de biopsia tumoral. En ciertas realizaciones preferidas, la muestra biológica es sangre, un ganglio linfático o médula ósea. En otras realizaciones del presente invento, el ganglio linfático puede ser un ganglio linfático centinela.

Resultará evidente que los presentes métodos pueden ser empleados en la detección de una gran variedad de cánceres. Los cánceres ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, leucemia, melanoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer endometrial.

Ciertas realizaciones ejemplares del presente invento proporcionan métodos en que los polinucleótidos que se van a detectar son seleccionados del grupo que consiste en mamaglobina, lipofilina B, GABA $\pi$  (B899P), B726P, B511S, B533S, B305D y B311D. Alternativa y/o adicionalmente, los polinucleótidos que se van a detectar pueden ser seleccionados del grupo que consiste en los representados en la ID. SEC. nº 73, ID. SEC. nº 74, ID. SEC. nº 75, ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 3, ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6, ID. SEC. nº 7, ID. SEC. nº 11, ID. SEC. nº 13, ID. SEC. nº 15, ID. SEC. nº 17, ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23, ID. SEC. nº 24, ID. SEC. nº 30, ID. SEC. nº 32 e ID. SEC. nº 76.

Las sondas y/o cebadores oligonucleotídicos ejemplares adecuados que pueden utilizarse de acuerdo con los métodos del presente invento se describen aquí mediante las ID. SEC. números 33-35 y 63-72. En ciertas realizaciones preferidas en que se elimina la detección de fondo de DNA genómico, los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos que abarcan intrones. Los oligonucleótidos ejemplares que abarcan intrones, adecuados para la detección de diversos polinucleótidos aquí descritos, se representan en las ID. SEC. números 36-62.

Dependiendo de la aplicación concreta considerada, el técnico puede preferir detectar los polinucleótidos tisular y/o tumoralmente específicos detectando un radiomarcador y detectando un fluoróforo. Más específicamente, la sonda

y/o el cebador oligonucleotídicos pueden comprender un resto detectable tal como, por ejemplo, un radiomarcador y/o un fluoróforo.

Alternativa o adicionalmente, los métodos del presente invento pueden comprender también una operación de fraccionamiento antes de la detección de los polinucleótidos tisular y/o tumoralmente específicos, tal como, por ejemplo, una electroforesis en gel.

En otra realizaciones, los métodos aquí descritos pueden ser utilizados para controlar el progreso del cáncer. Mediante estas realizaciones, se pueden llevar a cabo a lo largo del tiempo ensayos como los proporcionados para el diagnóstico de un cáncer y se puede evaluar el cambio del nivel de polipéptido(s) o polinucleótido(s) reactivo(s). Por ejemplo, los ensayos pueden ser llevados a cabo cada 24-72 horas durante un periodo de 6 meses a 1 año y, más adelante, pueden ser llevados a cabo cuando sea necesario. En general, un cáncer progresa en aquellos pacientes en que el nivel del polipéptido o polinucleótido detectado aumenta con el tiempo. Por contraste, el cáncer no progresa cuando el nivel del polipéptido o polinucleótido reactivo permanece constante o disminuye con el tiempo.

Ciertos ensayos diagnósticos *in vivo* pueden ser llevados directamente a cabo sobre un tumor. Uno de tales ensayos implica poner células tumorales en contacto con un agente ligante. El agente ligante unido puede ser luego detectado directa o indirectamente por medio de un grupo informador. Dichos agentes ligantes pueden ser también usados en aplicaciones histológicas. Alternativamente, se pueden usar sondas polinucleotídicas en tales aplicaciones.

Como se indicó anteriormente, para mejorar la sensibilidad, se pueden analizar múltiples marcadores proteicos de tumor de mama en una muestra dada. Resultará evidente que, en un solo ensayo, pueden combinarse agentes ligantes específicos para diferentes proteínas aquí proporcionadas. Además, se pueden usar concurrentemente múltiples cebadores o sondas. La selección de marcadores proteicos de tumores puede basarse en experimentos rutinarios para determinar combinaciones que den lugar a una sensibilidad óptima. Además, o alternativamente, los ensayos para proteínas tumorales aquí proporcionados se pueden combinar con ensayos para otros antígenos tumorales conocidos.

#### *Enriquecimiento celular*

En otros aspectos del presente invento, se pueden usar tecnologías de captura celular antes de la detección polinucleotídica, para mejorar la sensibilidad de las diversas metodologías de detección aquí descritas.

Se pueden utilizar metodologías de enriquecimiento celular ejemplares en que se emplean glóbulos inmunomagnéticos que están revestidos con anticuerpos monoclonales específicos para marcadores de la superficie celular, o complejos de anticuerpos tetrámeros, para primero enriquecer una muestra en células cancerosas o seleccionar positivamente células cancerosas de una muestra. Se pueden utilizar diversos sistemas comercialmente asequibles, incluyendo Dynabeads® Epithelial Enrich (Dynal Biotech, Oslo, Noruega), StemSep™ (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, British Columbia, Canadá) y RosetteSep (StemCell Technologies). El técnico experto reconocerá que también se pueden emplear adecuadamente otras metodologías y sistemas fácilmente asequibles para enriquecer en, o seleccionar positivamente, poblaciones celulares deseadas.

Dynabeads® Epithelial Enrich contiene glóbulos magnéticos revestidos con anticuerpos monoclonales (mAb; del inglés, monoclonal antibody) específicos para dos antígenos glicoproteínicos de membrana expresados en tejidos epiteliales normales y neoplásicos. Se pueden añadir los glóbulos revestidos a una muestra y luego aplicar la muestra a un imán, capturándose de este modo las células unidas a los glóbulos. Las células indeseadas son separadas por lavado, y las células magnéticamente aisladas son eluidas de los glóbulos y utilizadas en otros análisis.

Se puede utilizar RosetteSep para enriquecer celularmente una muestra de sangre de forma directa, y consiste en un coctel de anticuerpos tetrámeros que se dirigen a una diversidad de células indeseadas y las enlazan a la glicoforina A de los glóbulos rojos (RBC; del inglés, red blood cells) presentes en la muestra, formándose rosetas. Cuando se realiza una centrifugación sobre Fycoll, se forma un sedimento de las células diana junto con los RBC libres.

La combinación de anticuerpos en el cóctel de agotamiento determina qué células serán eliminadas y, en consecuencia, qué células serán recuperadas. Los anticuerpos que están disponibles incluyen, pero no se limitan a: CD2, CD3, CD4, CD5, o la CD8, CD10, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD29, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD66B, CD66e, HLA-DR, IgE y TCR $\alpha\beta$ . Además, se contempla en el presente invento que puedan desarrollarse mABs específicos para antígenos de tumor de mama y utilizarse de un modo similar. Por ejemplo, mABs que se unen a antígenos tumoralmente específicos de la superficie celular pueden ser conjugados con glóbulos magnéticos, o formulados en un complejo de anticuerpos tetrámeros, y utilizados para enriquecer una muestra en células metastásicas de tumor de mama o seleccionar positivamente células metastásicas de tumor de mama de una muestra.

Una vez que una muestra ha sido enriquecida o positivamente seleccionada, las células pueden ser adicionalmente analizadas. Por ejemplo, se pueden lisar las células y aislar el RNA. El RNA puede ser luego sometido a un análisis mediante RT-PCR usando cebadores múltiples específicos de tumor de mama en un ensayo de PCR en tiempo real como el aquí descrito.



En otro aspecto del presente invento, se pueden utilizar tecnologías de captura celular junto con PCR en tiempo real para obtener una herramienta más sensible para la detección de células metastásicas que expresan antígenos de tumor de mama. Es deseable la detección de células de cáncer de mama en muestras de médula ósea, sangre periférica y muestras obtenidas por aspiración con aguja pequeña, para el diagnóstico y el pronóstico de pacientes con cáncer de mama.

#### *Sondas y cebadores*

Como se indicó anteriormente y como se describe aquí con mayor detalle, en ciertos métodos, composiciones y sistemas de acuerdo con el presente invento se utilizan dos o más parejas de cebadores oligonucleotídicos para la detección del cáncer. La capacidad de dichas sondas de ácido nucleico para hibridarse específicamente con una secuencia de interés permitirá que sean utilizadas para detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra biológica.

Alternativamente, en otras realizaciones, las sondas y/o cebadores del presente invento pueden emplearse para detección por medio de la hibridación de ácido nucleico. Se considera que, de por sí, los segmentos de ácido nucleico que comprenden una región de secuencia de una secuencia contigua de al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud que tiene la misma secuencia que, o es complementaria de, una secuencia contigua de 15 nucleótidos de longitud de un polinucleótido que se va a detectar serán particularmente útiles. En ciertas realizaciones, también tendrán utilidad unas secuencias idénticas o complementarias contiguas más largas, por ejemplo, las de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 o 1000 (incluyendo todas las longitudes intermedias), e incluso hasta las secuencias de longitud completa.

Los cebadores oligonucleotídicos que tienen regiones de secuencia que consisten en tramos nucleotídicos contiguos de 10-14, 15-20, 30, 50 o incluso 100-200 nucleótidos o así (incluyendo también las longitudes intermedias), idénticas a, o complementarias de, un polinucleótido que se va a detectar, son particularmente considerados como cebadores para uso en reacciones de multiplicación tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR™). Esto permitiría que un polinucleótido fuera analizado en diversas muestras biológicas, tales como, por ejemplo, sangre, ganglios linfáticos y médula ósea.

El uso de un cebador de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud permite la formación de una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. Se prefieren generalmente las moléculas que tienen secuencias complementarias contiguas a lo largo de tramos superiores a 15 bases de longitud, con objeto de aumentar la estabilidad y la selectividad del híbrido y mejorar por ello la calidad y el grado de las moléculas híbridas específicas obtenidas. Generalmente se preferirá diseñar cebadores que tengan tramos génicamente complementarios de 15 a 25 nucleótidos contiguos, o incluso más largos cuando sea deseable.

Los cebadores pueden ser seleccionados de cualquier porción del polinucleótido que se va a detectar. Todo lo que se necesita es revisar la secuencia, tal como los polinucleótidos ejemplares expuestos en las ID. SEC. números 1, 3, 5-7, 11, 13, 15, 17, 19-24, 30, 32, 73-75 (Figuras 3-6, respectivamente) y 76 (lipofilina B), o cualquier porción continua de la secuencia, de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud hasta, e incluyendo, la secuencia de longitud completa, que uno desea utilizar como cebador. La elección de las secuencias cebadoras puede venir determinada por diversos factores. Por ejemplo, se puede querer emplear cebadores dirigidos hacia los extremos de la secuencia total. Los cebadores ejemplares aquí descritos pueden ser opcionalmente utilizados por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios del polinucleótido entero de interés, tal como el expuesto en las ID. SEC. números 1, 3, 5-7, 11, 13, 15, 17, 19-24, 30, 32, 73-75 (Figuras 3-6, respectivamente) y 76 (lipofilina B).

El presente invento proporciona además la secuencia nucleotídica de diversos cebadores y sondas oligonucleotídicos ejemplares, expuestos en las ID. SEC. números 33-71, que se pueden utilizar, como aquí se describe con mayor detalle, de acuerdo con los métodos del presente invento para la detección del cáncer.

Los cebadores oligonucleotídicos de acuerdo con el presente invento pueden ser fácilmente preparados de forma rutinaria mediante métodos comúnmente asequibles al técnico experto, incluyendo, por ejemplo, la síntesis directa de los cebadores por medios químicos, como se lleva habitualmente a la práctica usando un sintetizador de oligonucleótidos automatizado. Dependiendo de la aplicación prevista, se deseará típicamente emplear condiciones variables de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de la sonda hacia la secuencia diana. Para aplicaciones en que se requiera una elevada selectividad, se deseará típicamente emplear condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos; por ejemplo, se seleccionarán condiciones de concentración de sal relativamente baja y/o temperatura relativamente elevada, tal como se proporciona mediante una concentración de sal de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M y temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Dichas condiciones selectivas toleran poco apareamiento erróneo, si acaso alguno, entre la sonda y el molde o cadena diana y serían particularmente adecuadas para aislar secuencias relacionadas.

#### *Técnicas para multiplicación de polinucleótidos*

Cada una de las realizaciones específicas aquí esbozadas para la detección del cáncer tiene en común la detección de un polinucleótido tisular y/o tumoralmente específico a través de la hibridación de uno o más cebadores y/o sondas oligonucleotídicos. Dependiendo de factores tales como el número relativo de células cancerosas presentes en la

muestra biológica y/o el nivel de expresión polinucleotídica en cada célula cancerosa, puede ser preferible llevar a cabo una operación de multiplicación antes de llevar a cabo las operaciones de detección. Por ejemplo, se pueden emplear al menos dos cebadores oligonucleotídicos en un ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para multiplicar una porción de un cDNA de tumor de mama procedente de una muestra biológica, siendo al menos uno de los cebadores oligonucleotídicos específico para (es decir, se hibrida con) un polinucleótido que codifica la proteína de tumor de mama. El cDNA multiplicado puede ser opcionalmente sometido a una operación de fraccionamiento, tal como, por ejemplo, una electroforesis en gel.

Se dispone de diversos procedimientos, dependientes de molde, para multiplicar las secuencias diana de interés presentes en una muestra. Uno de los métodos de multiplicación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR<sup>TM</sup>), que se describe con detalle en las Patentes de EE.UU. números 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad. En resumen, en la PCR<sup>TM</sup>, se preparan dos secuencias cebadoras que son complementarias de regiones presentes en cadenas complementarias opuestas de la secuencia diana. Se añade un exceso de desoxinucleósido trifosfatos a una mezcla de reacción junto con una DNA polimerasa (por ejemplo, Taq polimerasa). Si la secuencia diana está presente en una muestra, los cebadores se unirán a la diana y la polimerasa causará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia diana mediante la adición de nucleótidos. Elevando y reduciendo la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán de la diana para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán a la diana y al producto de reacción, y el proceso se repite. Preferiblemente, puede llevarse a cabo un procedimiento de transcripción inversa y multiplicación por PCR<sup>TM</sup> con objeto de cuantificar la cantidad de mRNA multiplicado. Las metodologías de la reacción en cadena de la polimerasa son bien conocidas en la técnica.

En una metodología preferida para la multiplicación de polinucleótidos se emplea la RT-PCR, en la cual se aplica la PCR junto con la transcripción inversa. Típicamente, se extrae RNA de una muestra biológica, tal como sangre, suero, ganglio linfático, médula ósea, esputo, orina y muestras de biopsias tumorales, y se somete a transcripción inversa para producir moléculas de cDNA. La multiplicación por PCR en que se utiliza al menos un cebador específico genera una molécula de cDNA que puede ser separada y visualizada usando, por ejemplo, electroforesis en gel. La multiplicación puede ser llevada a cabo sobre muestras biológicas extraídas de un paciente y de un individuo que no está afectado por un cáncer. La reacción de multiplicación puede ser llevada a cabo sobre diversas diluciones de cDNA que abarquen dos órdenes de magnitud. Un aumento de expresión del doble o más en varias diluciones de la muestra de ensayo del paciente en comparación con las mismas diluciones de la muestra no cancerosa es típicamente considerado positivo.

Para llevar a cabo la operación de multiplicación se puede utilizar cualquiera de una diversidad de sistemas comercialmente asequibles. Una de dichas técnicas de multiplicación es la PCR inversa (véase Triglia *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16: 8186, 1988), en la que se utilizan enzimas de restricción para generar un fragmento en la región conocida del gen. El fragmento es luego hecho circular por ligación intramolecular y es utilizado como molde para PCR con cebadores divergentes procedentes de la región conocida. En un planteamiento alternativo, secuencias adyacentes a una secuencia parcial pueden ser recuperadas por multiplicación con un cebador para una secuencia conectora y un cebador específico para una región conocida. Las secuencias multiplicadas son típicamente sometidas a un segundo ciclo de multiplicación con el mismo cebador conector y con un segundo cebador específico para la región conocida. En el documento WO 96/38591 se describe una variación de este procedimiento, en la que se emplean dos cebadores que inician la extensión en direcciones opuestas a partir de la secuencia conocida. Otra de dichas técnicas es conocida como "multiplicación rápida de extremos de cDNA" o RACE. Esta técnica implica el uso de un cebador interno y un cebador externo, que se hibrida con una región de poliA o una secuencia vector, para identificar secuencias que son 5' y 3' con respecto a una secuencia conocida. Técnicas adicionales incluyen la PCR de captura (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic.* 1: 111-19, 1991) y la PCR ambulante ("walking") (Parker *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 19: 3055-60, 1991). Para obtener una secuencia de cDNA de longitud completa se pueden emplear también otros métodos en que se utiliza multiplicación.

Otro método para multiplicación es la reacción en cadena de la ligasa (LCR), descrita en la Publicación de Solicitud de Patente Europea n° 320.308 (específicamente incorporada aquí por referencia en su totalidad). En LCR, se preparan dos parejas de sondas complementarias y, en presencia de la secuencia diana, cada pareja se unirá a cadenas complementarias opuestas de la diana de modo que queden apoyadas. En presencia de una ligasa, las dos parejas de sondas se unirán para formar una sola unidad. Mediante termociclación, como en la PCR<sup>TM</sup>, las unidades ligadas unidas se disocian de la diana y sirven luego como "secuencias diana" para la ligación de parejas de sondas en exceso. En la Patente de EE.UU. n° 4.883.750, incorporada aquí por referencia en su totalidad, se describe un método alternativo de multiplicación similar a la LCR, para unir parejas de sondas a una secuencia diana.

También se puede utilizar la replicasa de Qbeta, descrita en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT n° PCT/US87/00880, incorporada aquí por referencia en su totalidad, como aún otro método de multiplicación en el presente invento. En este método, una secuencia replicativa de RNA que tiene una región complementaria de la de una diana es añadida a una muestra en presencia de una RNA polimerasa. La polimerasa copiará la secuencia replicativa, que puede ser luego detectada.

Un método de multiplicación isotérmica, en que se utilizan endonucleasas de restricción y ligasas para lograr la multiplicación de moléculas diana que contienen nucleótido 5'-[ $\alpha$ -tio]trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción (Walker *et al.*, 1992, incorporado aquí por referencia en su totalidad), puede ser también útil en la multiplicación de ácidos nucleicos en el presente invento.

La multiplicación por desplazamiento de cadenas (SDA) es otro método para llevar a cabo la multiplicación isotérmica de ácidos nucleicos, que implica múltiples ciclos de desplazamiento y síntesis de cadenas, es decir, traslado de cortes. Un método similar llamado reacción en cadena con reparación (RCR; del inglés, *repair chain reaction*) es otro método de multiplicación que puede ser útil en el presente invento e implica la hibridación de varias sondas a lo largo de una región específica para multiplicación, seguida de una reacción de reparación en que sólo están presentes dos de las cuatro bases. Las otras dos bases pueden ser añadidas como derivados biotinilados para una sencilla detección. Un planteamiento similar se utiliza en la SDA.

También se pueden detectar secuencias usando una reacción cíclica de sondas (CPR). En la CPR, una sonda que tiene unas secuencias 3' y 5' de DNA no diana y una secuencia interna o "central" del RNA específico de la proteína diana es hibridada con DNA que está presente en una muestra. Tras la hibridación, la mezcla de reacción es tratada con RNasa H, y los productos de la sonda son identificados como productos distintivos al generarse una señal que es liberada después de la digestión. El molde original se hibrida con otra sonda de ciclación y se repite la reacción. De este modo, la CPR implica multiplicar una señal generada mediante la hibridación de una sonda con un ácido nucleico expresado, específico de un gen diana.

En la Solicitud de Patente de Gran Bretaña nº 2.202.328 y en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT nº PCT/US89/01025 se describen aún otros métodos de multiplicación que pueden ser útiles de acuerdo con el presente invento. En la primera solicitud, se utilizan cebadores "modificados" en una síntesis de tipo PCR, dependiente de molde y enzima. Los cebadores pueden ser modificados mediante marcación con un resto de captura (por ejemplo, biotina) y/o un resto detector (por ejemplo, una enzima). En la segunda solicitud, se añade un exceso de sondas marcadas a una muestra. En presencia de la secuencia diana, la sonda se une y es escindida catalíticamente. Después de la escisión, la secuencia diana es liberada intacta para resultar unida por la sonda en exceso. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana.

Otros procedimientos para la multiplicación de ácido nucleico incluyen sistemas de multiplicación basados en transcripción (TAS) (Kwoh *et al.*, 1989; Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT nº WO 88/10315), incluyendo la multiplicación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) y la 3SR. En la NASBA, los ácidos nucleicos pueden ser preparados para multiplicación mediante extracción estándar con fenol/cloroformo, desnaturación térmica de una muestra, tratamiento con tampón de lisis y columnas para minicentrifugas para aislamiento de DNA y RNA, o extracción de RNA con cloruro de guanidinio. Estas técnicas de multiplicación implican hibridar un cebador que tiene secuencias específicas de la secuencia diana. Después de la polimerización, los híbridos de DNA/RNA son digeridos con RNasa H mientras que las moléculas de DNA de doble cadena son de nuevo térmicamente desnaturadas. En cualquier caso, el DNA de cadena sencilla es hecho totalmente de cadena doble mediante la adición de un segundo cebador específico para la diana, seguida de polimerización. Las moléculas de DNA de cadena doble son luego múltiplemente transcritas por una polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los RNAs son inversamente transcritos a DNA y son transcritos una vez más con una polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, sean truncados o sean completos, indican secuencias específicas de la diana.

En la Publicación de Solicitud de Patente Europea nº 329.822, incorporada aquí por referencia en su totalidad, se describe un procedimiento para multiplicación de ácido nucleico que implica sintetizar cíclicamente RNA de cadena sencilla (ssRNA; del inglés, *single-stranded RNA*), ssDNA y DNA de cadena doble (dsDNA; del inglés, *double-stranded DNA*), que pueden ser utilizados de acuerdo con el presente invento. El ssRNA es un primer molde para un primer oligonucleótido cebador, que es alargado mediante una transcriptasa inversa (DNA polimerasa dependiente de RNA). El RNA es luego separado del dúplex DNA:RNA resultante por la acción de ribonucleasa H (RNasa H, una RNasa específica para RNA en un dúplex con DNA o RNA). El ssDNA resultante es un segundo molde para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de RNA polimerasa (ejemplificado por la RNA polimerasa de T7) 5' en cuanto a su homología con a su molde. Este cebador es luego extendido por DNA polimerasa [ejemplificada por el fragmento grande ("Klenow") de la DNA polimerasa I de *E. coli*], resultando en forma de molécula de DNA de doble cadena (dsDNA) que tiene una secuencia idéntica a la del RNA original entre los cebadores y que tiene además una secuencia promotora en un extremo. Esta secuencia promotora puede ser utilizada por la RNA polimerasa apropiada para crear muchas copias RNA del DNA. Estas copias pueden volver a entrar luego en el ciclo, lo que conduce a una multiplicación muy rápida. Con la elección apropiada de las enzimas, esta multiplicación puede realizarse isotérmicamente sin la adición de enzimas en cada ciclo. A causa de la naturaleza cíclica de este proceso, la secuencia de partida puede ser escogida para que esté en forma de DNA o RNA.

En la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT nº WO 89/06700 se describe un esquema de multiplicación de secuencias de ácido nucleico basado en la hibridación de una secuencia promotora/cebadora con un DNA de cadena sencilla (ssDNA) diana, seguida de la transcripción de muchas copias RNA de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevos moldes a partir de los transcritos de RNA resultantes. Otros métodos de multiplicación incluyen "RACE" (Frohman, 1990) y "PCR de un lado" (Ohara, 1989), que son bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica.

#### *Composiciones y sistemas para la detección del cáncer*

El presente invento proporciona además sistemas para uso en cualquiera de los métodos diagnósticos anteriores. Dichos sistemas comprenden típicamente dos o más componentes necesarios para llevar a cabo un ensayo diagnóstico. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, recipientes y/o equipos. Por ejemplo un recipiente de un sistema

puede contener un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, que se une específicamente a una proteína de tumor de mama. Dichos anticuerpos o fragmentos pueden ser proporcionados fijados a un material de soporte, como se describió anteriormente. Uno o más recipientes adicionales pueden contener elementos, tales como reactivos o tampones, para ser utilizados en el ensayo. Dichos sistemas pueden contener también, o alternativamente, un reactivo de detección como el anteriormente descrito que contiene un grupo informador adecuado para la detección directa o indirecta de la unión del anticuerpo.

El presente invento también proporciona sistemas que son adecuados para llevar a cabo los métodos de detección del presente invento. Los sistemas ejemplares comprenden pares de cebadores oligonucleotídicos, cada uno de los cuales se hibrida específicamente con un polinucleótido distinto. En ciertas realizaciones, los sistemas de acuerdo con el presente invento pueden comprender también una ácido nucleico polimerasa y un tampón adecuado. Los cebadores oligonucleotídicos ejemplares adecuados para los sistemas del presente invento son aquí descritos mediante las ID. SEC. números 33-71. Los polinucleótidos ejemplares adecuados para los sistemas del presente invento se describen en la ID. SEC. n° 73, ID. SEC. n° 74, ID. SEC. n° 75, ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 3, ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6, ID. SEC. n° 7, ID. SEC. n° 11, ID. SEC. n° 13, ID. SEC. n° 15, ID. SEC. n° 17, ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23, ID. SEC. n° 24, ID. SEC. n° 30 e ID. SEC. n° 32 y la lipofilina B.

Alternativamente, se puede diseñar un sistema para detectar, en una muestra biológica, el nivel de mRNA que codifica una proteína de tumor de mama. Dichos sistemas comprenden generalmente al menos una sonda o cebador oligonucleotídico, como se describió anteriormente, que se hibrida con un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama. Dicho oligonucleótido puede ser utilizado, por ejemplo, en una PCR o en un ensayo de hibridación. Los componentes adicionales que pueden estar presentes en dichos sistemas incluyen un segundo oligonucleótido y/o un recipiente o reactivo diagnóstico para facilitar la detección de un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama.

En otros aspectos relacionados, el presente invento proporciona además composiciones útiles en los métodos aquí descritos. Las composiciones ejemplares comprenden dos o más pares de cebadores oligonucleotídicos, cada uno de los cuales se hibrida específicamente con un polinucleótido distinto. Los cebadores oligonucleotídicos ejemplares adecuados para las composiciones del presente invento son aquí descritos mediante las ID. SEC. números 33-71. Los polinucleótidos ejemplares adecuados para las composiciones del presente invento se describen en la ID. SEC. n° 73, ID. SEC. n° 74, ID. SEC. n° 75, ID. SEC. n° 1, ID. SEC. n° 3, ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6, ID. SEC. n° 7, ID. SEC. n° 11, ID. SEC. n° 13, ID. SEC. n° 15, ID. SEC. n° 17, ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23, ID. SEC. n° 24, ID. SEC. n° 30 e ID. SEC. n° 32 y la lipofilina B.

Los ejemplos siguientes se presentan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Representación diferencial*

Este ejemplo describe el uso de la representación diferencial para el enriquecimiento en polinucleótidos que están sobreexpresados en tejidos tumorales de mama.

La representación diferencial fue llevada a cabo del modo descrito en la bibliografía [véase, por ejemplo, P. Liang *et al.*, *Science* 257: 967-971 (1993)] con las modificaciones siguientes: (a) los productos de multiplicación por PCR fueron visualizados en geles teñidos con plata, (b) se usaron pares genéticamente equiparados de tejidos para eliminar la variación polimórfica y (c) se utilizaron dos diluciones diferentes de cDNA como molde para eliminar los efectos relativos a la dilución [véase E. Mou *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199; 564-569 (1994)].

### Ejemplo 2

#### *Preparación de un banco de sustracción de cDNA*

En este ejemplo se describe la preparación de un banco de sustracción de cDNA de tumor de mama, enriquecido en cuanto a polinucleótidos específicos de tumor de mama.

La sustracción de bancos de cDNA fue llevada a cabo del modo descrito [véase T. Hara *et al.*, *Blood* 84; 189-199 (1994)] con cierta modificación. El banco de tumor de mama (trazador; “tracer” en inglés,) que se realizó a partir de una colección de tres tumores de mama fue sustraído con un banco de mama normal (conductor; “driver” en inglés) para identificar genes específicos de tumor de mama. En sustracciones más recientes se utilizaban 6-10 tejidos normales como conductor para sustraer más eficazmente los genes comunes, haciendo hincapié en tejidos esenciales junto con un tejido “inmunológico” (por ejemplo, bazo, ganglio linfático o PBMC), para facilitar la separación de cDNAs procedentes de infiltración linfocitaria en tumores. El banco de cDNA sustraído, específico de tumor de mama, fue generado del modo siguiente: el banco de cDNA conductor fue digerido con EcoRI, NotI y SfuI (SfuI escinde el vector), y rellenado con fragmento Klenow de DNA polimerasa. Después de una extracción con fenol-cloroformo y una precipitación con etanol, el DNA fue marcado con biotina Photoprobe y disuelto en H<sub>2</sub>O. El banco

de cDNA trazador fue digerido con BamHI y XhoI, sometido a extracción con fenol-cloroformo, hecho pasar a través de columnas Chromaspin-400, precipitado con etanol, y mezclado con el DNA conductor para una hibridación a 68°C durante 20 horas [hibridación larga (LH; del inglés, *long hybridization*)]. La mezcla de reacción fue luego sometida a tratamiento con estreptavidina seguido de extracción con fenol/cloroformo un total de cuatro veces. El DNA sustraído fue precipitado y fue sometido de nuevo a una hibridación a 68°C durante 2 horas con DNA conductor [hibridación corta (SH; del inglés, *short hybridization*)]. Después de la separación del DNA de doble cadena biotinilado, se ligó el cDNA sustraído en el sitio BamHI/XhoI de pBCSK<sup>+</sup> resistente a cloranfenicol y se transformaron con él células *E. coli* DH10B ElectroMax mediante electroporación para generar el banco de cDNA sustraído. Para clonar los genes específicos de tumor de mama menos abundantes, se repitió la sustracción del banco de cDNA sustrayendo el banco de cDNA trazador con el banco de cDNA conductor más abundantes cDNAs procedentes de sustracciones primarias. Esto dio lugar al agotamiento de estas secuencias abundantes y a la generación de bancos de sustracción que contenían secuencias menos abundantes.

Para analizar el banco de cDNA sustraído, se preparó DNA plasmídico a partir de 100-200 clones independientes que fueron escogidos aleatoriamente del banco sustraído, y se caracterizó por secuenciación de DNA. El cDNA determinado y las secuencias de aminoácidos esperadas para los cDNAs aislados fueron comparados con secuencias conocidas usando las más recientes bases de datos Genbank y EST humana.

### Ejemplo 3

#### *Sustracción por PCR*

En este ejemplo se describe la sustracción por PCR para enriquecimiento en cuanto a polinucleótidos específicos de tumor de mama.

La sustracción por PCR fue llevada esencialmente a cabo del modo descrito en la bibliografía; véanse L. Diatchenko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030 (1996), y G. P. Yang *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27: 1517-23 (1999). En resumen, este tipo de sustracción actúa por ligación de dos adaptadores diferentes a diferentes partes alícuotas de una muestra de cDNA comprobador (tumor de mama) digerida con enzimas de restricción, seguida del mezclamiento separado de los comprobadores ("tester" en inglés) con conductor en exceso (sin adaptadores). Esta primera hibridación da lugar a la normalización del cDNA específico comprobador de cadena sencilla a causa de la cinética de segundo orden de la hibridación. Luego se mezclan estas mezclas separadas de reacción de hibridación, sin desnaturalización, y se lleva a cabo una segunda hibridación que produce las moléculas diana, fragmentos de cDNA de doble cadena que contienen ambos adaptadores diferentes. Se llevaron a cabo dos ciclos de PCR, lo que dio lugar a la multiplicación exponencial de las moléculas de la población diana (cDNAs específicos comprobadores normalizados), mientras que otros fragmentos quedaron sin multiplicar o sólo fueron multiplicados de modo lineal. Las sustracciones llevadas a cabo incluían una colección de tumores de mama sustraídos con una colección de mama normal, y una colección de tumores de mama sustraídos con una colección de tejidos normales que incluían PBMC, cerebro, páncreas, hígado, intestino delgado, estómago, corazón y riñón.

Antes de la síntesis de cDNA, el RNA fue tratado con DNasa I (Ambion) en presencia de RNasina (Promega Biotech, Madison, Wisconsin, EE.UU.) para eliminar la contaminación por DNA. El cDNA para uso en los grupos tisulares para PCR en tiempo real fue preparado usando 25 µl de cebador Oligo dT (Boehringer-Mannheim) con transcriptasa inversa Superscript II (Gibco BRL, Bethesda, Maryland, EE.UU.).

### Ejemplo 4

#### *Detección de cáncer de mama usando antígenos específicos de mama*

El aislamiento y la caracterización de los antígenos B511S y B533S específicos de mama se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. número 09/346.327, presentada el 2 de julio de 1999, cuya descripción se incorpora aquí por referencia en su totalidad. La determinada secuencia de cDNA para B511S se proporciona en la ID. SEC. n° 30, proporcionándose la correspondiente secuencia de aminoácidos en la ID. SEC. n° 31. La determinada secuencia de cDNA para B533S se proporciona en la ID. SEC. n° 32. El aislamiento y la caracterización del antígeno B726P específico de mama se describen en las Solicitudes de Patente de EE.UU. números 09/285.480, presentada el 2 de Abril de 1999, y 09/433.826, presentada el 3 de Noviembre de 1999.

Las determinadas secuencias de cDNA para variantes de corte y empalme de B726P se proporcionan en las ID. SEC. números 13, 15, 17 y 19-24, proporcionándose las correspondientes secuencias de aminoácidos en las ID. SEC. números 14, 16, 18 y 25-29.

El aislamiento y la caracterización de las formas A y C del antígeno B305D específico de mama se han descrito en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 09/429.755, presentada el 28 de Octubre de 1999. Las determinadas secuencias de cDNA para las isoformas A y C de B305D se proporcionan en las ID. SEC. números 1, 3 y 5-7, proporcionándose las correspondientes secuencias de aminoácidos en las ID. SEC. números 2, 4 y 8-10.

El aislamiento y la caracterización del antígeno B311D específico de mama se han descrito en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 09/289.198, presentada el 9 de Abril de 1999.

## ES 2 281 416 T3

La determinada secuencia de cDNA para B311D se proporciona en la ID. SEC. nº 11, proporcionándose la correspondiente secuencia de aminoácidos en la ID. SEC. nº 12.

Las secuencias de cDNA para la mamaglobina se proporcionan en las Figuras 4 y 5, proporcionándose la secuencia de cDNA para GABA $\pi$  en la Figuras 6, y se describen en las ID. SEC. números 73-75, respectivamente.

El aislamiento y la caracterización del antígeno lipofilina B específico de mama se han descrito en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 09/780.842, presentada el 8 de Febrero de 2001. La determinada secuencia de cDNA para lipofilina B se proporciona en la ID. SEC. nº 76, proporcionándose la correspondiente secuencia de aminoácidos en la ID. SEC. nº 77. En la Solicitud 09/780.842 también se describen las secuencias de nucleótidos de diversas variantes de secuencia de la lipofilina B.

### Ejemplo 5

#### 15 *Análisis en micromatriz*

En este ejemplo se describe el uso de análisis en micromatriz para identificar polinucleótidos que están sobreexpresados al menos al doble en muestras de tejido tumoral de mama en comparación con muestras de tejido normal de mama.

La expresión de mRNA de los polinucleótidos de interés fue llevada a cabo del modo siguiente. Se preparó cDNA para los diferentes genes del modo anteriormente descrito y se dispuso matricialmente en un portaobjetos de vídeo (Incyte, Palo Alto, California, EE.UU.). El cDNA matricialmente dispuesto fue luego hibridado con una mezcla 1:1 de cDNAs de primera cadena marcados con el colorante fluorescente Cy3 o Cy5, obtenidos de RNA poliA+ de tumores de mama, mama normal y tejidos normales y otros tumores, como describen D. Shalon *et al.*, *Genome Res* 6: 639-45 (1996). Típicamente, se fijaron Cy3 (Sonda 1) a cDNAs de tumores de mama y Cy5 (Sonda 2) a tejido normal de mama o a otros tejidos normales. Se dejó que ambas sondas compitieran con los cDNAs génicamente específicos inmovilizados del chip, y se realizó un lavado y luego una exploración en cuanto a la intensidad de la fluorescencia individual de Cy3 y Cy5 para determinar el grado de hibridación. Los datos fueron analizados usando el software GEMTOOLS (Incyte, Palo Alto, California, EE.UU.), lo que permitía que los patrones de sobreexpresión de los tumores de mama fueran comparados con los de tejidos normales mediante las relaciones Cy3/Cy5. La intensidad de la fluorescencia estaba también relacionada con el nivel de expresión de los genes individuales.

Los análisis en micromatriz de DNA fueron utilizados esencialmente como una herramienta de exploración para determinar la especificidad tisular/tumoral de cDNAs recuperados de la representación diferencial, el banco de cDNA y las sustracciones por PCR, antes de un análisis más riguroso mediante RT-PCR cuantitativa, transferencia Northern e inmunohistoquímica. El análisis en micromatriz fue llevado a cabo sobre dos microchips. Se evaluó un total de 3603 moldes de cDNA sustraído y 197 moldes de representación diferencial, para identificar 40 candidatos para un ulterior análisis por PCR cuantitativa. Entre estos candidatos, se eligieron varios basándose en unos favorables perfiles de especificidad tisular, incluyendo B305D, B311D, B726P, B511S y B533S, lo que indicaba sus perfiles de sobreexpresión en tumores de mama y/o mama normal frente a otros tejidos normales. Resultó evidente que la expresión de estos genes mostraba un elevado grado de especificidad para tumores de mama y/o tejido de mama. Además, estos genes tienen perfiles de expresión complementarios en muchos casos.

Los dos genes específicos de mama conocidos, mamaglobina y subunidad  $\pi$  del receptor tipo A de  $\gamma$ -aminobutirato (GABA $\pi$ ) fueron también sometidos al análisis en micromatriz. Se ha descrito previamente que la expresión de mRNA de mamaglobina está suprarregulada en el tejido de mama proliferante, incluyendo los tumores de mama; véanse Watson *et al.*, *Cancer Res.* 56: 860-5 (1996); Watson *et al.*, *Cancer Res.* 59: 3028-3031 (1999); Watson *et al.*, *Oncogene* 16: 817-24 (1998).

Los niveles de mRNA de GABA $\pi$  estaban sobreexpresados en los tumores de mama. Estudios previos habían demostrado su sobreexpresión en el útero y, en cierto grado, en la próstata y el pulmón [Hedblom *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 15.346-15.350 (1997)] pero ningún estudio previo había indicado niveles elevados en tumores de mama.

### 55 Ejemplo 6

#### *Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real*

En este ejemplo se describe el uso de la PCR cuantitativa en tiempo real para confirmar la identificación, por micromatrices, de polinucleótidos que están sobreexpresados al menos al doble en muestras de tejido tumoral de mama en comparación con muestras de tejido normal de mama.

La especificidad tumoral y/o tisular de los polinucleótidos identificados mediante los análisis en micromatriz aquí descritos en el Ejemplo 5 fue confirmada mediante análisis por PCR cuantitativa. Se analizaron metástasis de mama, tumores de mama, trastornos benignos de mama y tejido normal de mama junto con otros tejidos normales y tumores en una PCR cuantitativa (tiempo real). Esto fue llevado a cabo en un sistema para detección de secuencias ABI 7700 Prism o GeneAmp® 5700 (PE Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). El sistema 7700 utiliza un cebador directo y un cebador inverso en combinación con una sonda específica diseñada para que se hibride con una secuencia entre

los cebadores directo e inverso. Esta sonda fue conjugada en el extremo 5' con un colorante informador fluorescente y en el otro extremo 3' con un colorante sofocador (Taqman™). Durante la PCR, la DNA polimerasa Taq, con su actividad nucleasa 5'-3', escindió la sonda, que comenzó a emitir fluorescencia, lo que permitió que la reacción fuera controlada por el aumento de fluorescencia (tiempo real); véase Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280 (1991). El sistema 5700 utilizaba SYBR® Green, un colorante fluorescente que sólo se une a DNA de doble cadena [Schneeberger *et al.*, *PCR Methods Appl.* 4: 234-8 (1995)], y los mismos cebadores directo e inverso que el instrumento 7700. No se necesitó sonda alguna. Se diseñaron cebadores de apareamiento y sondas fluorescentes para cada uno de los genes de acuerdo con el programa Primer Express (PE Biosystems, Foster City, California, EE.UU.).

TABLA 1

| Secuencias de los cebadores y la sonda para los genes de interés |                                                        |                                                          |                                                                 |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|                                                                  | Cebador directo                                        | Cebador inverso                                          | Sonda                                                           |
| Mamaglobina                                                      | TGCCATAGATG<br>AATTGAAGGAA TG<br>(ID. SEC nº 48)       | TGTCATATATTAA<br>TTGCATAAACACC TCA<br>(ID. SEC nº 49)    | TCTTAACCAAACG<br>GATGAAACTCTGA<br>GCAATG (ID. SEC nº 50)        |
| Forma C de B305D                                                 | AAAGCAGATGG<br>TGGTTGAGGTT<br>(ID. SEC nº 39)          | CCTGAGACCAAA<br>TGGCTTCTTC<br>(ID. SEC nº 40)            | ATTCCATGCCGGC<br>TGCTTCTTCTG<br>(ID. SEC nº 41)                 |
| B311D                                                            | CCGCTTCTGACA<br>ACACTAGAGAT C<br>(ID. SEC nº 63)       | CCTATAAAGATGT<br>TATGTACCAAAA ATGAAGT<br>(ID. SEC nº 64) | CCCCTCCCTCAGG<br>GTATGGCCC<br>(ID. SEC nº 65)                   |
| B726P                                                            | TCTGGTTTTCTC<br>ATTCTTTATTCA TTTATT<br>(ID. SEC nº 42) | TGCCAAGGAGCG<br>GATTATCT<br>(ID. SEC nº 43)              | CAACCACGTGACA<br>AACACTGGAATTA CAGG<br>(ID. SEC nº 44)          |
| B533S                                                            | CCCTTTCTCACC<br>CACACACTGT<br>(ID. SEC nº 66)          | TGCATTCTCTCAT<br>ATGTGGAAGCT<br>(ID. SEC nº 67)          | CCGGGCCTCAGGC<br>ATATACTATTCTA<br>CTGTCTG (ID. SEC nº 68)       |
| GABA $\pi$                                                       | AAGCCTCAGAG<br>TCCTTCCAGTAT G<br>(ID. SEC nº 36)       | AAATATAAGTGA<br>AGAAAAAATTA GTAGAT<br>(ID. SEC nº 72)    | AATCCATTGTATC<br>TTAGAACCGAGGG<br>ATTTGTTTGA<br>(ID. SEC nº 38) |
| B511S                                                            | GACATTCCAGTT<br>TTACCCAAATG G<br>(ID. SEC nº 69)       | TGCAGAAGACTC<br>AAGCTGATTCC<br>(ID. SEC nº 70)           | TCTCAGGGACACA<br>CTCTACCATTCGGGA<br>(ID. SEC nº 71)             |

Las concentraciones usadas en la PCR cuantitativa para los cebadores directos para mamaglobina, GABA $\pi$ , la forma C de B305D, B311D, B511S, B533S y B726P fueron 900, 900, 300, 900, 900, 300 y 300 nM, respectivamente. Para los cebadores inversos, fueron 300, 900, 900, 900, 300, 900 y 900 nM, respectivamente. Los cebadores y las sondas así producidos fueron usados en el programa de termociclación universal de la PCR en tiempo real, y fueron titulados para determinar las concentraciones óptimas usando un planteamiento de tablero de ajedrez. En este procedimiento de optimización se usó una colección de cDNA de tumores diana. La reacción se llevó a cabo en volúmenes de 25  $\mu$ l. La concentración final de sonda fue 160 nM en todos los casos. La concentración de dATP, dCTP y dGTP fue 0,2 mM, y la de dUTP fue 0,4 mM. Se utilizaron 0,625 unidades y 0,25 unidades de AmpliTaq Gold y AmpErase UNG (PE Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) por reacción. La concentración final de MgCl<sub>2</sub> fue 5 mM. Se añadieron cantidades mínimas de glicerol, gelatina y Tween 20 (Sigma Chem. Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.) para estabilizar la reacción. Cada mezcla de reacción contenía 2  $\mu$ l de molde diluido. El cDNA de las reacciones de RT, preparado del modo anterior, fue diluido 1:10 para el gen de interés y 1:100 para la  $\beta$ -actina. Se usaron cebadores y sondas para  $\beta$ -actina (PE Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) de una manera similar para cuantificar la presencia de  $\beta$ -actina en las muestras. En el caso del ensayo con SYBR® Green, la mezcla de reacción (25  $\mu$ l) incluía 2,5  $\mu$ l de tampón para SYBR® Green, 2  $\mu$ l de molde de cDNA y 2,5  $\mu$ l de cada uno de los cebadores directo e inverso para el gen de interés. Esta mezcla también contenía MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 0,25 unidades de AmpErase UNG, 0,625 unidades de AmpliTaq Gold, glicerol al 0,08%, gelatina al 0,05%, Tween 20 al 0,0001% y mezcla de dNTPs 1 mM. En ambos sistemas, se llevaron a cabo 40 ciclos de multiplicación.

Con objeto de cuantificar la cantidad de cDNA específico (y, por lo tanto, el mRNA inicial) en la muestra, se generó una curva patrón para cada experimento utilizando el plásmido que contiene el gen de interés. Se generaron curvas patrón utilizando los valores de Ct determinados en la PCR en tiempo real, que estaban relacionados con la concentración inicial de cDNA utilizada en el ensayo. Para este fin, se utilizaron diluciones de patrón que variaban de 20 a 2 x 10<sup>6</sup> copias del gen de interés. Además, se generó una curva patrón para el gen doméstico (necesario para la integridad celular) de  $\beta$ -actina, que variaba de 200 fg a 2000 pg, para permitir la normalización con respecto a una cantidad constante de  $\beta$ -actina. Esto permitía la evaluación de los niveles de sobreexpresión vistos con cada uno de los genes.

Los genes B311D, B533S y B726P fueron evaluados en una PCR cuantitativa como la anteriormente descrita, sobre dos grupos diferentes que consistían en: (a) tumor de mama, mama normal y tejidos normales; y (b) metástasis de tumores de mama (esencialmente ganglios linfáticos), usando los cebadores y las sondas anteriormente mostrados en la Tabla 1. Los datos para el grupo (a) se muestran en la Figura 1 para los tres genes. Los tres genes mostraron idénticos perfiles de expresión en tejido de mama. Sin embargo, el nivel relativo de expresión génica fue muy diferente en cada caso. En general, B311D se expresaba con niveles menores que B533S y ambos menos que B726P, pero los tres estaban limitados a tejido de mama. De este modo, la PCR cuantitativa confirmó que había una expresión diferencial entre tejido normal de mama y tumores de mama para los tres genes y que aproximadamente el 50% de los tumores de mama sobreexpresaban estos genes. Cuando se analizaron sobre un grupo de metástasis distantes derivadas de cánceres de mama, los tres genes reaccionaban con 14 de 21 metástasis y presentaban perfiles similares. Los tres genes también presentaban niveles crecientes de expresión en función de la fase patológica del tumor, como se muestra para B533S en la Figura 2.

La mamaglobina es un producto homólogo de una uteroglobina de conejo y de la subunidad C3 de la proteína ligante de esteroides de rata, y es una proteína de bajo peso molecular que está muy glicosilada. Se ha comunicado que la mamaglobina, por contraste con sus productos homólogos, es específica de la mama, y se ha descrito su sobreexpresión en biopsias de tumores de mama (23%) y en tumores de mama primarios y metastásicos (~ 75%), comunicándose la detección de expresión de mRNA de mamaglobina en el 91% de los ganglios linfáticos de pacientes con cáncer metastásico de mama. Sin embargo, un análisis más riguroso de la expresión génica de mamaglobina mediante micromatriz y PCR cuantitativa del modo anteriormente descrito [grupos (a) y (b) y un grupo de otros tumores y tejidos normales y tumores de mama adicionales], mostró niveles significativos de expresión en piel y glándula salival con niveles mucho menores en esófago y tráquea, como se muestra a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

| Distribución normalizada de mRNA de mamaglobina y B511S en diversos tejidos |                                                              |               |                                                       |               |                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------|
| Tejido                                                                      | Copias medias de mamaglobina/ng de $\beta$ -actina $\pm$ SD* | PCR positivas | Copias medias de B511S/ng de $\beta$ -actina $\pm$ SD | PCR positivas | PCR positivas (mamaglobina/B511S) |
| Tumores de mama                                                             | 1233,88 $\pm$ 3612,74                                        | 31/42         | 1800,40 $\pm$ 3893,24                                 | 33/42         | 38/42                             |
| Metástasis de tumor de mama                                                 | 1912,54 $\pm$ 4625,85                                        | 14/24         | 3329,50 $\pm$ 10.820,71                               | 14/24         | 17/24                             |
| Trastornos benignos de mama                                                 | 121,87 $\pm$ 78,63                                           | 3/3           | 524,66 $\pm$ 609,43                                   | 2/3           | 3/3                               |
| Mama normal                                                                 | 114,19 $\pm$ 94,40                                           | 11/11         | 517,64 $\pm$ 376,83                                   | 8/9           | 11/11                             |
| Reducción de mama                                                           | 231,50 $\pm$ 276,68                                          | 2/3           | 482,54 $\pm$ 680,28                                   | 1/2           | 2/3                               |
| Otros tumores                                                               | 0,13 $\pm$ 0,65                                              | 1/39          | 24,17 $\pm$ 36,00                                     | 5/23          |                                   |
| Glándula salival                                                            | 435,65 $\pm$ 705,11                                          | 2/3           | 45,766,61 $\pm$ 44.342,43                             | 3/3           |                                   |
| Piel                                                                        | 415,74 $\pm$ 376,14                                          | 7/9           | 7039,05 $\pm$ 7774,24                                 | 9/9           |                                   |
| Esófago                                                                     | 4,45 $\pm$ 3,86                                              | 2/3           | 1,02 $\pm$ 0,14                                       | 0/3           |                                   |
| Bronquios                                                                   | 0,16                                                         | 0/1           | 84,44 $\pm$ 53,31                                     | 2/2           |                                   |
| Otros tejidos normales                                                      | 0,33 $\pm$ 1,07                                              | 0/85          | 5,49 $\pm$ 10,65                                      | 3/75          |                                   |

SD (del inglés, standard deviation) significa "desviación estándar"



El gen B511S específico de mama, aunque tiene un diferente perfil de reactividad sobre tumores de mama y tejido normal de mama con respecto a la mamaglobina, reaccionaba con el mismo subconjunto de tejidos normales con que lo hacía la mamaglobina. Un análisis PSORT de B511S indica que tiene un marco de lectura abierto (ORF; del inglés, *open reading frame*) de 90 aminoácidos y que es una proteína secretada, como es el caso de la mamaglobina. No hay evidencia de que B511S tenga un dominio transmembranal pero puede contener una secuencia señal escindible. La mamaglobina detectó 14 de 24 tumores metastásicos distantes de mama y 31 de 42 tumores de mama, y presentaba una sobreexpresión 10 veces mayor en tumores y metástasis en comparación con el tejido normal de mama. Hubo una sobreexpresión al menos 300 veces mayor en tejido normal de mama frente a otros tumores y tejidos normales negativos analizados, que eran esencialmente negativos en cuanto a la expresión de mamaglobina. B511S detectó 33 de 42 tumores de mama y 14 de 24 metástasis distantes, mientras que se prevé que una combinación de B511S y mamaglobina detectaría 38 de 42 tumores de mama y 17 de 24 lesiones metastásicas (véase la Tabla 2 anterior). Los niveles cuantitativos de expresión de B511S y mamaglobina estaban también en intervalos similares, en concordancia con los perfiles de micromatriz observados para estos dos genes. En la Tabla 3 se muestran otros genes que fueron aditivos con la mamaglobina.

TABLA 3

| Complementación de mRNA de mamaglobina con otros genes |                      |                      |            |       |                    |                            |
|--------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|------------|-------|--------------------|----------------------------|
|                                                        | Mamaglobina positiva | Mamaglobina negativa |            |       |                    |                            |
|                                                        |                      | B305D                | GABA $\pi$ | B726P | B305D + GABA $\pi$ | B305D + GABA $\pi$ + B726P |
| Metástasis de mama                                     | 13/21                | 2/8                  | 5/8        | 3/8   | 7/8                | 8/8                        |
| Tumores de mama                                        | 18/25                | 3/7                  | 4/7        | 5/7   | 7/7                | 7/7                        |

Se mostró que B305D está muy sobreexpresado en tumores de mama, tumores de próstata, tejido normal de próstata y testículo en comparación con tejidos normales, incluyendo el tejido normal de mama. Se han identificado diferentes variantes de corte y empalme de B305D, siendo las formas A y C las más abundantes aunque todas las formas analizadas tienen perfiles tisulares similares en la PCR cuantitativa. Las formas A y C contienen ORFs de 320 y 385 aminoácidos, respectivamente. Por PSORT, se prevé que B305D es una proteína de membrana de Tipo II que comprende una serie de repeticiones de anquirina. Un gen conocido del que se mostró que era complementario de B305D en tumores de mama era GABA $\pi$ . Este gen es un miembro de la familia de receptores GABA $_A$  y codifica una proteína que tiene 30-40% de homología de aminoácidos con respecto a otros miembros de la familia y, mediante un análisis por transferencia Northern, se ha mostrado que está sobreexpresado en el pulmón, el timo y la próstata en niveles bajos y muy sobreexpresado en el útero. No se ha descrito previamente su expresión en tejido de mama. Esto contrasta con otros receptores GABA $_A$  que tienen una apreciable expresión en tejidos neuronales. La perfiladura de expresión tisular de este gen mostró que está sobreexpresado en tumores de mama en una relación inversa con el gen B305D (Tabla 3). GABA $\pi$  detectó 15 de 25 tumores y 6 de 21 metástasis incluyendo 4 tumores y 5 metástasis errados por la mamaglobina. Por contraste, B305D detectó 13 de 25 tumores de mama y 8 de 21 metástasis, incluyendo de nuevo 3 tumores y 2 metástasis errados por la mamaglobina. Se prevé que una combinación de justo B305D y GABA $\pi$  identificaría 22 de 25 tumores de mama y 14 de 21 metástasis. La combinación de B305D y GABA $\pi$  con mamaglobina para detectar metástasis de mama se muestra en la Tabla 3 anterior y en las Figuras 3A y 3B. Esta combinación detectó 20 de 21 metástasis de mama así como 25 de 25 tumores de mama, que fueron evaluados en los mismos grupos para los tres genes. La única metástasis de mama que resultó negativa para estos tres genes fue intensamente positiva para B726P (Figuras 3A y 3B).

Para evaluar la presencia de células tumorales circulantes, se empleó un método de inmunocaptura (captura celular) para realizar primero un enriquecimiento en cuanto a células epiteliales antes del análisis por RT-PCR. Para este fin, se usaron glóbulos de poliestireno inmunomagnéticos revestidos con anticuerpos monoclonales específicos hacia dos glicoproteínas de la superficie de las células epiteliales. Dicho procedimiento de enriquecimiento aumentó la sensibilidad de detección (~ 100 veces) en comparación con el aislamiento directo de RNA poliA+, como se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

| Extracción de células positivas para mamaglobina (MB415) introducidas en sangre completa y detección por PCR en tiempo real |                                                |                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------|
| Células MB415/ml de sangre                                                                                                  | Extracción de células epiteliales (RNA poliA+) | Extracción directa (RNA poliA+) |
| Copias de mamaglobina/ng de $\beta$ -actina                                                                                 |                                                |                                 |
| 100.000                                                                                                                     | 54.303,2                                       | 58.527,1                        |
| 10.000                                                                                                                      | 45.761,9                                       | 925,9                           |
| 1000                                                                                                                        | 15.421,2                                       | 61,6                            |
| 100                                                                                                                         | 368,0                                          | 5,1                             |
| 10                                                                                                                          | 282,0                                          | 1,1                             |
| 1                                                                                                                           | 110,2                                          | 0                               |
| 0                                                                                                                           | 0                                              | 0                               |

Se introdujeron células positivas para mamaglobina (MB415) en diversas concentraciones en sangre completa y luego se extrajeron usando enriquecimiento de células epiteliales o aislamiento directo de sangre. Utilizando procedimientos de enriquecimiento, se halló que el mRNA de mamaglobina era detectable en niveles mucho menores que cuando se utilizaba el aislamiento directo. Muestras de sangre completa de pacientes con cáncer metastásico de mama fueron posteriormente tratadas con los glóbulos inmunomagnéticos. Luego se aisló RNA poliA+, y se preparó cDNA y se sometió a PCR cuantitativa usando dos cebadores génicamente específicos (Tabla 1) y una sonda fluorescente (Taqman™). Como se observó en los tejidos de cáncer de mama, también se vio complementación en la detección de células tumorales circulantes derivadas de cánceres de mama. Una vez más, la PCR de mamaglobina permitió detectar células tumorales circulantes en un elevado porcentaje de las muestras sanguíneas, aunque en niveles bajos, procedentes de pacientes con cáncer metastásico de mama (20 de 32) cuando se compararon con las muestras de sangre normal (Tabla 5), pero varios de los otros genes analizados hasta la fecha aumentaban más este índice de detección. Estos incluían B726P, B305D, B311D, B533S y GABA $\pi$ . El nivel de detección de mamaglobina en muestras sanguíneas de pacientes con cáncer metastásico de mama es mayor que el previamente descrito (62% frente a 49%), a pesar de analizarse volúmenes de sangre más pequeños, probablemente a causa del uso de un enriquecimiento específico de marcadores epiteliales en este estudio. Una combinación de todos los genes analizados indica que 27 de 32 muestras eran positivas para uno o más de estos genes.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 5

| Complementación génica en células epiteliales aisladas de sangre de individuos normales y pacientes con cáncer metastásico de mama |              |       |       |       |       |            |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------|
| Id. de la muestra                                                                                                                  | Mama-globina | B305D | B311D | B533S | B726P | GABA $\pi$ | Combinación |
| 2                                                                                                                                  | +            | -     | -     | +     | -     | -          | +           |
| 3                                                                                                                                  | +            | -     | -     | +     | -     | -          | +           |
| 5                                                                                                                                  | +            | +     | +     | -     | +     | -          | +           |
| 6                                                                                                                                  | +            | -     | +     | +     | +     | -          | +           |
| 8                                                                                                                                  | -            | -     | +     | -     | -     | -          | +           |
| 9                                                                                                                                  | +            | +     | +     | -     | +     | -          | +           |
| 10                                                                                                                                 | +            | -     | +     | -     | +     | -          | +           |
| 11                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | -     | -          | -           |
| 12                                                                                                                                 | +            | +     | +     | -     | -     | -          | +           |
| 13                                                                                                                                 | -            | -     | -     | +     | -     | -          | +           |
| 15                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | -     | -          | -           |
| 18                                                                                                                                 | +            | -     | -     | -     | -     | -          | +           |
| 19                                                                                                                                 | +            | -     | -     | -     | -     | +          | +           |
| 21                                                                                                                                 | +            | -     | -     | -     | -     | -          | +           |
| 22                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | -     | -          | -           |
| 23                                                                                                                                 | +            | -     | -     | -     | -     | -          | +           |
| 24                                                                                                                                 | +            | -     | -     | -     | -     | -          | +           |
| 25                                                                                                                                 | -            | +     | -     | -     | -     | -          | +           |
| 26                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | -     | -          | -           |
| 29                                                                                                                                 | +            | -     | +     | +     | +     | -          | +           |
| 31                                                                                                                                 | +            | -     | -     | +     | -     | -          | +           |
| 32                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | -     | $\pm$      | $\pm$       |
| 33                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | +     | -          | +           |
| 34                                                                                                                                 | +            | -     | -     | +     | -     | +          | +           |
| 35                                                                                                                                 | +            | -     | -     | -     | +     | -          | +           |
| 36                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | -     | +          | +           |
| 37                                                                                                                                 | +            | -     | -     | +     | -     | -          | +           |
| 38                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | -     | -          | -           |
| 40                                                                                                                                 | +            | -     | -     | -     | -     | -          | +           |
| 41                                                                                                                                 | +            | -     | -     | +     | -     | -          | +           |
| 42                                                                                                                                 | +            | -     | -     | -     | -     | -          | +           |
| 43                                                                                                                                 | -            | -     | -     | -     | -     | +          | +           |

TABLA 5 (continuación)

| Complementación génica en células epiteliales aisladas de sangre de individuos normales y pacientes con cáncer metastásico de mama |              |       |       |       |       |            |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------|
| Id. de la muestra                                                                                                                  | Mama-globina | B305D | B311D | B533S | B726P | GABA $\pi$ | Combinación |
| Donante 104                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | +          | +           |
| Donante 348                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | Nd         | –           |
| Donante 392                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | Nd         | –           |
| Donante 408                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | Nd         | –           |
| Donante 244                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | –          | –           |
| Donante 355                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | –          | –           |
| Donante 264                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | –          | –           |
| Donante 232                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | Nd         | –           |
| Donante 12                                                                                                                         | –            | –     | –     | –     | –     | –          | –           |
| Donante 415                                                                                                                        | –            | –     | –     | –     | –     | Nd         | –           |
| Donante 35                                                                                                                         | –            | –     | –     | –     | –     | –          | –           |
| Sensibilidad                                                                                                                       | 20/32        | 4/32  | 7/32  | 9/32  | 7/32  | 4/32       | 27/32       |

En otros estudios, se emplearon cebadores específicos para mamaglobina, GABA $\pi$ , B305D (forma C) y B726P y sondas Taqman específicas en diferentes combinaciones para analizar sus perfiles combinados de expresión de mRNA en muestras de metástasis de mama (met M.) y tumor de mama (tumor M.) usando PCR en tiempo real. En la Tabla 1 se muestran los cebadores directo e inverso y las sondas empleados para mamaglobina, B305D (forma C) y B726P. En la Tabla 1 se muestran el cebador directo y la sonda empleados para GABA $\pi$ , siendo el cebador inverso el siguiente: TTCAAATATAAGTGAAGAAAAATTAGTAGATCAA (ID. SEC. nº 51). Como se muestra a continuación en la Tabla 6, se halló que una combinación de mamaglobina, GABA $\pi$ , B305D (forma C) y B726P detectaba 22 de 22 muestras de tumor de mama, viéndose un aumento de expresión en 5 muestras (indicado mediante ++).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 6

| Detección, por PCR en tiempo real, de muestras tumorales usando diferentes combinaciones de cebadores |             |                    |                            |                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Muestra tumoral                                                                                       | Mamaglobina | Mamaglobina + GABA | Mamaglobina + GABA + B305D | Mamaglobina + GABA + B305D + B726P |
| Met M. 316A                                                                                           |             | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 317A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 318A                                                                                           |             | +                  | +                          | ++                                 |
| Met M. 595A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 611A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 612A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 614A                                                                                           |             | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 616A                                                                                           |             | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 618A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 620A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 621A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 624A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 625A                                                                                           |             |                    | +                          | +                                  |
| Met M. 627A                                                                                           | +           |                    | +                          | +                                  |
| Met M. 629A                                                                                           |             | +                  | +                          | +                                  |
| Met M. 631A                                                                                           | +           | +                  | +                          | +                                  |
| Tumor M. 154A                                                                                         | +           | +                  | +                          | ++                                 |
| Tumor M. 155A                                                                                         | +           | +                  | +                          | ++                                 |
| Tumor M. 81D                                                                                          |             |                    | +                          | ++                                 |
| Tumor M. 209A                                                                                         |             | +                  | +                          | +                                  |
| Tumor M. 208A                                                                                         |             | +                  | +                          | ++                                 |
| Tumor M. 10A                                                                                          | +           | +                  | +                          | +                                  |

El aumento de señales de mensaje mediante la adición de cebadores específicos fue adicionalmente demostrado en un experimento en una sola placa en que se empleaban las cuatro muestras tumorales: met M. 316A, met M. 317A, tumor M. 81D y tumor M. 209A.

La expresión de una combinación de mamaglobina, GABA $\pi$ , B305D (forma C) y B726P en un grupo de muestras de tumor de mama y tejido normal fue también detectada utilizando PCR en tiempo real con un sistema de detección basado en SYBR Green, en lugar del procedimiento con sondas Taqman. Los resultados obtenidos al utilizar este sistema se muestran en la Figura 7.

#### Ejemplo 7

##### *PCR cuantitativa en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama*

Los conocidos genes evaluados en este estudio fueron mamaglobina y subunidad  $\pi$  del receptor tipo A de  $\gamma$ -aminobutirato (GABA $\pi$ ). Con objeto de identificar nuevos genes que estuvieran sobreexpresados en el cáncer de mama se usó aquí una versión mejorada de la técnica RT-PCR con representación diferencial (DDPCR; del inglés,

differential display PCR) [Liang *et al.*, *Science* 257: 967-971 (1993); Mou *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 564-569 (1994)], métodos de extracción de bancos de cDNA [Hara *et al.*, *Blood* 84: 189-199 (1994)] y sustracción por PCR [Diatchenko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030 (1996); Yang *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27: 1517-23 (1999)].

La representación diferencial dio lugar a la recuperación de dos fragmentos de cDNA denominados B305D y B311D [Houghton *et al.*, *Cancer Res.* 40: Extracto nº 217, 32-33 (1999)]. B511S y B533S son dos fragmentos de cDNA aislados al usar el procedimiento de sustracción de bancos de cDNA (manuscrito en preparación), mientras que el fragmento B726P de cDNA procedía de sustracción por PCR [Jiang *et al.*, *Proceedings of the Amer. Assoc. Cancer Res.* 40: Extracto nº 216, 32 (1999); Xu *et al.*, *Proceedings of the Amer. Assoc. Cancer Res.* 40: Extracto nº 2115, 319 (1999); y Molesh *et al.*, *Proceedings of Amer. Assoc. Cancer Res.* 11: Extracto nº 4330, 681 (2000)].

Tres de los nuevos genes, B311D, B533S y B726P, mostraban idénticos perfiles de expresión en tejido de mama mediante análisis por PCR cuantitativa. Estos genes fueron evaluados por PCR cuantitativa sobre dos grupos diferentes que consistían en (a) tumor de mama, tejido normal de mama y tejidos normales, y (b) metástasis de tumor de mama (principalmente ganglios linfáticos). En la Tabla 1 se muestran los cebadores y las sondas utilizados. Los datos para el grupo (a) se muestran en la Figura 2 para los tres genes. Globalmente, los perfiles de expresión son comparables y están en el mismo orden de clasificación; sin embargo, los niveles de expresión son considerablemente diferentes. En general, B311D se expresaba con niveles menores que B533S y ambos con niveles menores que B726P, pero los tres estaban limitados a tejido de mama. Se utilizaron las tres secuencias para buscar en la base de datos Genbank. Tanto la secuencia de B311D como la de B533S contienen diferentes secuencias repetitivas y no se ha identificado un ORF para ninguno de ellos. B726P es un gen nuevo, con corte y empalme de mRNA que produce varios supuestos ORFs diferentes.

La PCR cuantitativa confirmó que había una expresión diferencial de mRNA entre el tejido normal de mama y los tumores de mama, sobreexpresándose estos genes en aproximadamente el 50% de los tumores de mama. Cuando se analizaron en un grupo de metástasis distantes derivadas de cánceres de mama, los tres genes reaccionaban con 14 de 21 metástasis y presentaban perfiles similares (datos no mostrados). Resulta interesante que, cuando se analizaron en un grupo de cánceres de próstata, los tres genes identificaron los mismos 3 de 24 tumores de próstata pero con niveles de expresión mucho menores que en la mama. Este grupo de genes presentaba niveles crecientes de expresión en función de la fase patológica del tumor, como se muestra para B533S.

Un análisis más riguroso de la expresión génica de mamaglobina mediante micromatriz y PCR cuantitativa mostró niveles significativos de expresión en piel y glándula salival y niveles mucho menores en esófago y tráquea. B511S tenía un perfil de reactividad ligeramente diferente en tumores de mama y tejido normal de mama cuando se comparaba con mamaglobina, aunque reaccionaba igual que la mamaglobina con un subconjunto similar de tejidos normales. La mamaglobina detectó 14 de 24 tumores metastásicos distantes de mama y 31 de 42 tumores de mama, y presentaba una sobreexpresión 10 veces mayor en tumores y metástasis en comparación con el tejido normal de mama. Hubo una sobreexpresión de mamaglobina al menos 300 veces mayor en tejido normal de mama frente a otros tumores y tejidos normales negativos analizados. B511S detectó 33 de 42 tumores de mama y 14 de 24 metástasis distantes. Se prevé que una combinación de B511S y mamaglobina detecte 38 de 42 tumores de mama y 17 de 24 lesiones metastásicas. Los niveles cuantitativos de expresión de B511S y de mamaglobina estaban también en intervalos similares, en concordancia con los perfiles de micromatriz observados para estos dos genes.

Ciertos genes complementaban el perfil de expresión de la mamaglobina; es decir, se mostró que se expresaban en tumores en que no lo hacía la mamaglobina. B305D estaba muy sobreexpresado en tumores de mama, tumores de próstata, tejido normal de próstata y testículo en comparación con los tejidos normales, incluyendo el tejido normal de mama. Se identificaron diferentes variantes de corte y empalme de B305D, siendo las formas A y C las más abundantes. Todas las formas analizadas tenían perfiles tisulares similares en la PCR cuantitativa. Las formas A y C contienen ORFs de 320 y 385 aminoácidos, respectivamente. Un gen conocido del que se mostró que era complementario de B305D, en tumores de mama, era GABA $\pi$ . Este perfil de expresión tisular contrasta con el de otros receptores GABA $_A$  que tienen típicamente una apreciable expresión en tejidos neuronales. Una observación adicional fue que la perfiladura de expresión tisular de este gen mostraba que está sobreexpresado en tumores de mama en una relación inversa con el gen B305D (Tabla 3). GABA $\pi$  detectó 15 de 25 tumores y 6 de 21 metástasis incluyendo 4 tumores y 5 metástasis errados por la mamaglobina. Por contraste, B305D detectó 13 de 25 tumores de mama y 8 de 21 metástasis, incluyendo de nuevo 3 tumores y 2 metástasis errados por la mamaglobina. Se prevé que una combinación de justo B305D y GABA $\pi$  identifique 22 de 25 tumores de mama y 14 de 21 metástasis. Esta combinación detectó 20 de las 21 metástasis de mama así como 25 de 25 tumores de mama, que fueron evaluados en los mismos grupos para los tres genes. La única metástasis de mama que resultó negativa para estos tres genes fue intensamente positiva para B726P.

El uso de análisis en micromatriz seguido de PCR cuantitativa proporcionó una metodología para determinar precisamente la expresión de genes de cáncer de mama tanto en tejidos de mama (tumores y normales) como en tejidos normales, y para evaluar su potencial diagnóstico y terapéutico. Utilizando estas técnicas se evaluaron cinco genes nuevos y dos genes conocidos. Tres de estos genes, B311D, B533S y B726P, presentaban una expresión de mRNA concordante, y, colectivamente, los datos son coherentes con una expresión coordinada de estos tres loci a nivel de control de la transcripción. Los tres genes mostraban una expresión diferencial en tumores de mama frente a tejido normal de mama, y parecía que el nivel de sobreexpresión estaba relacionado con la fase patológica del tumor.

En el caso de la mamaglobina, se halló expresión en otros tejidos además de en tejido de mama. Se vio expresión en piel, en glándula salival y, en un grado mucho menor, en tráquea.

La expresión de GABA $\pi$  en tumores de mama fue también una observación nueva. Aunque la expresión de varios genes complementaba la vista con mamaglobina, se añadían dos genes en particular, B305D y GABA $\pi$ , a la sensibilidad diagnóstica de la detección de mamaglobina. Una combinación de estos tres genes permitió la detección de 45 (97,8%) de los 46 tumores de mama y metástasis evaluados. La inclusión de B726P permitió la detección de los 25 tumores de mama y las 21 metástasis distantes.

#### Ejemplo 8

##### *Enriquecimiento en células de cáncer de mama circulantes por inmunocaptura*

En este ejemplo se describe la sensibilidad potenciada que se alcanza mediante el uso de la metodología de captura celular por inmunocaptura para el enriquecimiento en células de cáncer de mama circulantes.

Para evaluar la presencia de células tumorales circulantes se adoptó un método de inmunocaptura para realizar primero un enriquecimiento en células epiteliales antes del análisis por RT-PCR. Se enriquecieron muestras sanguíneas en cuanto a células epiteliales con un método de separación por glóbulos inmunomagnéticos (Dynal A.S, Oslo, Noruega), utilizando glóbulos magnéticos revestidos con anticuerpos monoclonales específicos para antígenos glicopolipeptídicos de la superficie de células epiteliales humanas [Por ejemplo, F. Momburg *et al.*, *Cancer Res.* 41: 2883-91 (1997); B. Naume *et al.*, *Journal of Hemotherapy* 6: 103-113 (1997); B. Naume *et al.*, *Int. J. Cancer* 78: 556-60 (1998); V. M. Martin *et al.*, *Exp. Hematol.* 26: 252-64 (1998); M. Hildebrandt *et al.*, *Exp. Hematol.* 25: 57-65 (1997); M. C. Eaton *et al.*, *Biotechniques* 22: 100-5 (1997); y B. Brandt *et al.*, *Clin. Exp. Metastases* 14: 399-408 (1996), describen adecuados antígenos de superficie celular ejemplares. Se lisaron las células aisladas de este modo y se separaron los glóbulos magnéticos. El lisado fue luego procesado para el aislamiento de mRNA poliA+ usando glóbulos magnéticos (Dynabeads) revestidos con Oligo(dT)<sub>25</sub>. Después de un lavado de los glóbulos en el tampón del sistema, las muestras de glóbulo/RNA poliA+ fueron finalmente suspendidas en Tris-HCl 10 mM, pH de 8, y sometidas a transcripción inversa. El RNA fue luego sometido a PCR en tiempo real usando sondas y cebadores génicamente específicos con condiciones de reacción como las anteriormente esbozadas. El contenido de  $\beta$ -actina fue también determinado y utilizado para la normalización. Se consideraron positivas las muestras con copias del gen de interés/ng de  $\beta$ -actina superiores a la media de las muestras normales + 3 desviaciones estándares. La PCR en tiempo real sobre muestras sanguíneas fue llevada exclusivamente a cabo utilizando el procedimiento Taqman<sup>TM</sup> pero ampliando a 50 ciclos.

Se halló que el mRNA de mamaglobina obtenido al usar procedimientos de enriquecimiento era detectable en niveles mucho menores que cuando se utilizaba el aislamiento directo. Posteriormente, se trataron muestras de sangre completa de pacientes con cáncer metastásico de mama con los glóbulos inmunomagnéticos, y luego se aisló RNA poliA+, y se preparó cDNA y se sometió a PCR cuantitativa usando dos cebadores génicamente específicos para mamaglobina y una sonda fluorescente (Taqman<sup>TM</sup>). Como se observó en los tejidos de cáncer de mama, también se vio complementación en la detección de células tumorales circulantes derivadas de cánceres de mama. Una vez más, la PCR de mamaglobina permitió detectar células tumorales circulantes en un elevado porcentaje de sangres, aunque en niveles bajos, procedentes de pacientes con cáncer metastásico de mama (20 de 32) cuando se compararon con las muestras de sangre normal. Varios de los otros genes analizados hasta la fecha podrían aumentar más este índice de detección. Estos incluyen B726P, B305D, B311D, B533S y GABA $\pi$ . Una combinación de todos los genes analizados indica que 27 de 32 muestras eran positivas en uno o más de estos genes.

#### Ejemplo 9

##### *Detección múltiple de tumores de mama*

Se establecieron ensayos adicionales por PCR múltiple en tiempo real con objeto de detectar simultáneamente la expresión de cuatro genes específicos de cáncer de mama: lípofilina B, Gaba (B899P), B305D-C y B726P. Por contraste con los procedimientos de detección que se basan en un análisis de expresión de genes específicos de cáncer de mama individuales, este ensayo múltiple permitía detectar todas las muestras de tumor de mama ensayadas.

Este ensayo múltiple fue diseñado para detectar la expresión de lípofilina B en lugar de la de mamaglobina. A causa de sus perfiles de expresión similares, la lípofilina B puede sustituir a la mamaglobina en este ensayo de PCR múltiple para la detección del cáncer de mama. El ensayo fue llevado a cabo del modo siguiente: se utilizaron cebadores específicos de lípofilina B, B899P (Gaba), B305D y B726P y sondas Taqman específicas, para analizar su perfil combinado de expresión de mRNA en tumores de mama. A continuación se muestran los cebadores y las sondas:

Lípofilina B: Cebador directo (ID. SEC. nº 33): 5' TGCCCCCTCCGGAAGCT. Cebador inverso (ID. SEC. nº 34): 5' CGTTTCTGAAGGGACATCTGATC. Sonda (ID. SEC. nº 35) (FAM-5' - 3'-TAMRA): TTGCAGCCAAGTTAGGAGTGAAGAGATGCA.

## ES 2 281 416 T3

GABA (B899P): Cebador directo (ID. SEC. nº 36): 5' AAGCCTCAGAGTCCTTCCAGTATG. Cebador inverso (ID. SEC. nº 37): 5' TTCAAATATAAGTGAAGAAAAAATTAGTAGATCAA. Sonda (ID. SEC. nº 38) (FAM-5' - 3'-TAMRA): AATCCATTGTATCTTAGAACCGAGGGATTGTTTAGA.

B305D (forma C): Cebador directo (ID. SEC. nº 39): 5' AAAGCAGATGGTGGTTGAGGTT. Cebador inverso (ID. SEC. nº 40): 5' CCTGAGACCAAATGGCTTCTTC. Sonda (ID. SEC. nº 41) (FAM-5' - 3'-TAMRA) ATTCCATGCCGGCTGCTTCTTCTG.

B726P: Cebador directo (ID. SEC. nº 42): 5' TCTGGTTTTCTCATTCTTTATTCATTATT. Cebador inverso (ID. SEC. nº 43): 5' TGCCAAGGAGCGGATTATCT. Sonda (ID. SEC. nº 44) (FAM-5' - 3'-TAMRA): CAACCACGTGACAAACACTGGAATTACAGG.

Actina: Cebador directo (ID. SEC. nº 45): 5' ACTGGAACGGTGAAGGTGACA. Cebador inverso (ID. SEC. nº 46): 5' CGGCCACATTGTGAACCTTTG. Sonda (ID. SEC. nº 47): (FAM-5' - 3'-TAMRA): CAGTCGGTTGGAGCGAGCATCCC.

Las condiciones de ensayo fueron:

*Protocolo Taqman (Perkin Elmer 7700):*

En un volumen final de 25 µl: Tampón A 1x, MgCl<sub>2</sub> 5mM, dCTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,4 mM, dGTP 0,2 mM, 0,01 U/µl de AmpErase UNG, 0,025 U/µl de TaqGold, glicerol al 8% (volumen/volumen), gelatina al 0,05% (volumen/volumen), Tween20 al 0,01% (volumen/volumen), 4 picomoles de cada sonda Taqman génicamente específica (lipofilina B + Gaba + B305D + B726P), y cDNA molde (que se origina a partir de 0,02 µg de RNA poliA+): 100 nM de B726P-F + B726P-R, 300 nM de Gaba-R y 50 nM de de lipofilina B-F + lipofilina B-R + B305D-R + Gaba-R.

Se detectó expresión de lipofilina B en 14 de 27 muestras de tumor de mama. Sin embargo, el ensayo múltiple para lipofilina B, B899P, B305D-C y B726P permitió detectar una señal de expresión en 27 de 27 tumores, con un nivel de detección superior a 10 copias de mRNA/1000 pg de actina en la mayoría de las muestras y superior a 100 copias de mRNA/1000 pg de actina en 5 de las 27 muestras ensayadas (Figura 8).

### Ejemplo 10

#### *Optimización de la detección múltiple*

El ensayo de PCR múltiple en tiempo real anteriormente descrito fue utilizado para detectar simultáneamente la expresión de mamaglobina (o lipofilina B), Gaba (B899P), B305D-C y B726P. De acuerdo con este ejemplo, se optimizaron las condiciones de ensayo y las secuencias cebadoras para conseguir la multiplicación paralela de cuatro productos de PCR con diferentes longitudes. Las muestras positivas de este ensayo pueden ser adicionalmente caracterizadas por electroforesis en gel, y el(los) gen(es) de interés expresado(s) puede(n) ser determinado(s) de acuerdo con el(los) tamaño(s) del(de los) amplicón(es) detectado(s).

Se utilizaron cebadores específicos para mamaglobina (o lipofilina B), Gaba (B899P), B305D y B726P y sondas Taqman específicas, para detectar simultáneamente su expresión. A continuación se muestran los cebadores y sondas usados en este ejemplo.

Mamaglobina: Cebador directo (ID. SEC. nº 48): 5' TGCCATAGATGAATTGAAGGAATG. Cebador inverso (ID. SEC. nº 49): 5' TGTCATATATTAATTGCATAAACACCTCA. Sonda (ID. SEC. nº 50): (FAM-5' - 3'-TAMRA): TCTTAACCAAACGGATGAAAC-TCTGAGCAATG.

GABA (B899P): Cebador directo (ID. SEC. nº 36): 5' AAGCCTCAGAGTCCTTCCAGTATG. Cebador inverso (ID. SEC. nº 51): 5' ATCATTGAAAATTCAAATATAAGT-GAAG. Sonda (ID. SEC. nº 38) (FAM-5' - 3'-TAMRA): AATCCATTGTATCTTAGAACCGAGGGATTGTTTAGA.

B305D (forma C): Cebador directo (ID. SEC. nº 39): 5' AAAGCAGATGGTGGTTG-AGGTT. Cebador inverso (ID. SEC. nº 40): 5' CCTGAGACCAAATGGCTTCTTC. Sonda (ID. SEC. nº 41): (FAM-5' - 3'-TAMRA): ATTCCATGCCGGCTGCTTCTTCTG.

B726P: Cebador directo (ID. SEC. nº 52): 5' GTAGTTGTGCATTGAAATAATTATCATTAT. Cebador inverso (ID. SEC. nº 43): 5' TGCCAAGGAGCGGATTATCT. Sonda (ID. SEC. nº 44) (FAM-5' - 3'-TAMRA): CAACCACGTGACAAACACTGGAATTACAGG.

Se optimizaron las posiciones de los cebadores y las condiciones de ensayo para conseguir la multiplicación paralela de cuatro productos de PCR con diferentes tamaños. Las condiciones de ensayo fueron:



*Protocolo Taqman (Perkin Elmer 7700):*

En un volumen final de 25  $\mu$ l: Tampón A 1x, MgCl<sub>2</sub> 5mM, dCTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,4 mM, dGTP 0,2 mM, 0,01 U/ $\mu$ l de AmpErase UNG, 0,0375 U/ $\mu$ l de TaqGold, glicerol al 8% (volumen/volumen), gelatina al 0,05% (volumen/volumen), Tween20 al 0,01% (volumen/volumen), 4 picomoles de cada sonda Taqman génicamente específica (mamaglobina + Gaba + B305D + B726P), y cDNA molde (que se origina a partir de 0,02  $\mu$ g de RNA poliA+): 300 nM de Gaba-R + Gaba-F, 100 nM de mamaglobina-F+R; B726P-F+R y 50 nM de B305D-F+R.

*Protocolo de PCR*

50° durante 2': x 1; 95° durante 10': x 1; y 95° durante 15"/60° durante 1'/68° durante 1': x 50.

Puesto que, en el ensayo múltiple, cada conjunto de cebadores da lugar a una banda de longitud única, las señales de expresión de los cuatro genes de interés pueden ser medidas individualmente mediante análisis en gel de agarosa (véase la Figura 9), o la señal de expresión combinada de los cuatro genes puede ser medida en tiempo real en un sistema para detección de secuencias ABI 7700 Prism (PE Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). También se puede detectar la expresión de lipofilina B en lugar de la de mamaglobina. Aunque aquí se han descrito cebadores específicos, se podrían utilizar diferentes secuencias cebadoras, diferente sonda o marcación de sonda y diferentes sistemas de detección para llevar este ensayo múltiple a cabo. Por ejemplo, se podría incorporar un segundo colorante informador fluorogénico para la detección paralela de un gen de referencia por PCR en tiempo real, o, por ejemplo, se podría utilizar un sistema de detección con SYBR Green en lugar del procedimiento con sonda Taqman.

*Ejemplo 11*

*Diseño y uso de exclusión de DNA genómico, con pares de cebadores que abarcan zonas límite intrón-exón, para el ensayo múltiple del cáncer de mama*

El ensayo de PCR múltiple en tiempo real aquí descrito permite detectar simultáneamente la expresión de mamaglobina, Gaba (B899P), B305D-C y B726P. El nivel de expresión combinado de estos genes es medido en tiempo real en un sistema para detección de secuencias ABI 7700 Prism (PE Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Los genes individualmente expresados pueden ser también identificados mediante electroforesis en gel a causa de los diferentes tamaños de amplicón. Con objeto de utilizar este ensayo con muestras procedentes de RNAs no tratados con DNasa (por ejemplo, cDNA de ganglio linfático) y evitar el tratamiento de muestras de RNA pequeño (por ejemplo, muestras de sangre y aspiraciones de tumores y ganglios linfáticos) con DNasa, se han diseñado pares de cebadores que abarcan intrones para excluir la multiplicación de DNA genómico y, por lo tanto, eliminar señales positivas inespecíficas y falsas. La falsa señal positiva es causada por la contaminación de muestras de cDNA con DNA genómico. El ensayo múltiple optimizado aquí descrito excluye la multiplicación de DNA genómico y permite la detección específica de la expresión de genes diana sin la necesidad del tratamiento previo de las muestras de RNA con DNasa. Además, con estos conjuntos de cebadores se podría verificar la correspondencia genómica y la posición del límite intrón-exón.

Se utilizaron cebadores específicos para mamaglobina, Gaba (B899P), B305D y B726P y sondas Taqman específicas, para detectar simultáneamente su expresión (Tabla 7). Se optimizaron las posiciones de los cebadores (que abarcan zonas límite intrón-exón) para detectar exclusivamente cDNA y excluir el DNA genómico de la multiplicación. La identidad del(de los) gen(es) expresado(s) se determinó por electroforesis en gel.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 7

| Secuencias de cebadores que abarcan límites intrón-exón y de sonda para el ensayo múltiple de tumor de mama |                                               |                                                          |                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Gen                                                                                                         | Cebador directo                               | Cebador inverso                                          | Sonda Taqman (FAM-5' - 3'-TAMRA)                      |
| Mamaglobina                                                                                                 | tgccatagatgaattgaagga atg<br>(ID. SEC. N° 48) | tgtcatatattaatgcataaacacct<br>ca (ID. SEC. N° 49)        | tcttaacaaacggatgaactctgagca<br>atg (ID. SEC. N° 50)   |
| B899P                                                                                                       | aagcctcagagtcctccagta tg<br>(ID. SEC. N° 36)  | ttcaaatataagtgaagaaaaaatta<br>gtagatcaa (ID. SEC. N° 37) | aatccattgtatcttagaacggaggatt<br>gttt (ID. SEC. N° 62) |
| B305D                                                                                                       | aaagcagatggttggtgaggt t<br>(ID. SEC. N° 39)   | cctgagaccaaatggcttcttc<br>(ID. SEC. N° 40)               | attccatgccggctgcttctctg<br>(ID. SEC. N° 41)           |
| B726P                                                                                                       | tctggtttctcatcttattcat t<br>(ID. SEC. N° 42)  | tccaaggagcggattatct<br>(ID. SEC. N° 43)                  | caaccacgtgacaacactggaattaca<br>gg (ID. SEC. N° 44)    |
| Actina                                                                                                      | actggaacggtagagtgac a<br>(ID. SEC. N° 45)     | cgccacatgtgaacttg<br>(ID. SEC. N° 46)                    | cagtcgggtggagcgagcalccc<br>(ID. SEC. N° 47)           |
| B899P-INT                                                                                                   | caatttggtagagaacccg<br>(ID. SEC. N° 53)       | gctgctggaggatataggg<br>(ID. SEC. N° 54)                  | catttcagagagtaacatggactacaca<br>(ID. SEC. N° 55)      |
| B305D-INT                                                                                                   | tctgataaaggccgtacaatg<br>(ID. SEC. N° 56)     | tcacgactgctgttttgc<br>(ID. SEC. N° 57)                   | atcaaaaaacaagcatggcctcacacca<br>ct (ID. SEC. N° 58)   |
| B726P-INT                                                                                                   | gcaagtgcgaatgatcagagg<br>(ID. SEC. N° 59)     | atatagactcaggtatacacact<br>(ID. SEC. N° 60)              | tcccatcagaatccaacaagaggaaga<br>tg (ID. SEC. N° 61)    |

Se optimizaron las posiciones de los cebadores y las condiciones de ensayo para conseguir la multiplicación paralela de los cuatro productos de PCR. Las condiciones de ensayo fueron las siguientes:

#### Protocolo Taqman (Perkin Elmer 7700):

En un volumen final de 25  $\mu$ l: Tampón A 1x,  $MgCl_2$  5mM, dCTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,4 mM, dGTP 0,2 mM, 0,01 U/ $\mu$ l de AmpErase UNG, glicerol al 8% (volumen/volumen), gelatina al 0,05% (volumen/volumen), Tween20 al 0,01% (volumen/volumen), 4 picomoles de cada sonda Taqman génicamente específica (mamaglobina + B899P-INT + B305D-INT + B726P-INT), y cDNA molde (que se origina a partir de 0,02  $\mu$ g de RNA poliA+): 300 nM de B305D-INT-F; B899P-INT-F, 100 nM de mamaglobina-F+R; B726P-INT-F+R, 50 nM de B899P-INT-R; B305D-INT-R.

#### Condiciones de los ciclos de PCR

1 ciclo a 50°C durante 2 minutos, 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos, 50 ciclos de 95°C durante 1 minuto y 68°C durante 1 minuto.

La Figura 10 muestra una comparación entre el ensayo múltiple en que se usan cebadores que abarcan límites intrón-exón (grupo inferior) y el ensayo múltiple en que se usan cebadores no optimizados (grupo superior), para detectar células de cáncer de mama en un grupo de tejidos de ganglio linfático. Este experimento muestra que usando los cebadores que abarcan intrones-exones del presente invento se consigue la reducción del fondo que resulta de la contaminación de las muestras por DNA genómico.

#### Ejemplo 12

#### Detección múltiple de células metastatizadas de tumor de mama en muestras de biopsias de ganglios linfáticos centinela

La graduación de ganglios linfáticos es importante para determinar la quimioterapia y la terapia hormonal adyuvante apropiadas. Por contraste con la disección axilar convencional, la biopsia del ganglio linfático centinela es un planteamiento menos invasivo para la graduación de la mínima enfermedad residual. La biopsia del ganglio linfático centinela (SLNB; del inglés, *sentinel lymph node biopsy*) tiene el potencial para mejorar la detección de metástasis y proporcionar valores de pronóstico que conduzcan a una terapia con una mínima morbosidad asociada con la disección

completa de ganglios linfáticos. La SLNB ocasiona el mapeo de uno o los dos ganglios linfáticos que esencialmente drenan el tumor y que, por lo tanto, muy probablemente contienen la enfermedad metastásica (los ganglios centinela). El análisis patológico rutinario de los ganglios linfáticos da lugar a un elevado índice de falsos negativos: un tercio de las mujeres con ganglios linfáticos patológicamente negativos desarrollan una enfermedad recurrente (Bland: The Breast; Saunders, 1991). Una técnica de detección más sensible para células tumorales sería la RT-PCR, pero su aplicación se encuentra limitada por la falta de marcadores específicos individuales. El ensayo con múltiples marcadores anteriormente descrito aumenta la probabilidad de detección de cáncer en la población sin producir falsos resultados positivos a partir de ganglios linfáticos normales.

Como se mencionó anteriormente, las vías linfáticas aferentes de un tumor primario drenan en un solo ganglio, el ganglio linfático centinela, antes de que tenga lugar el drenaje en la cuenca linfática regional. Los ganglios linfáticos centinela son localizados con colorantes y/o coloides radiomarcados inyectados en la zona de la lesión primaria, y la biopsia del ganglio linfático centinela permite el examen patológico en cuanto a depósitos micrometastásicos y la graduación de la axila, y, por lo tanto, puede evitar una disección axilar innecesaria. Las micrometástasis ganglionares pueden ser localizadas con tinción (hematoxilina o eosina) o por análisis inmunohistoquímico para proteínas citoqueratínicas. Las técnicas de tinción inmunocitoquímicas pueden producir frecuentemente falsos resultados negativos al saltarse pequeños focos metastásicos a causa de un fraccionamiento inadecuado del ganglio. La inmunohistoquímica puede dar lugar a falsos resultados positivos a causa de una ilógica expresión de citoqueratinas (células reticuloendoteliales), o a falsos resultados negativos cuando se usa el anticuerpo Ber-Ep4, cuyo antígeno correspondiente no se expresa en todas las células tumorales.

El ensayo múltiple aquí descrito podría proporcionar una herramienta de detección más sensible para ganglios linfáticos centinela positivos. Además, es deseable la detección de células de cáncer de mama en muestras de médula ósea, sangre periférica y muestras obtenidas por aspiración con aguja pequeña, para el diagnóstico y el pronóstico de pacientes con cáncer de mama.

Utilizando el aquí descrito ensayo de PCR múltiple que abarca límites intrón-exón, se analizaron veintidós muestras de ganglios linfáticos metastásicos además de 15 muestras también previamente analizadas y mostradas en la Figura 3A. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 8. También se analizaron veintisiete tumores primarios, y los resultados se muestran en la Tabla 9. Veinte muestras de ganglios linfáticos normales analizadas usando este ensayo resultaron todas negativas.

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 281 416 T3

TABLA 8

| Análisis de 37 ganglios linfáticos metastásicos por PCR múltiple en tiempo real |             |       |       |       |          |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|-------|-------|----------|
| Muestras de ganglios linfáticos metastásicos de mama                            | Mamaglobina | B305D | B899P | B726P | Múltiple |
| Met M. 317A                                                                     | ++          | +     |       | +     | +++      |
| Met M. 318A                                                                     |             |       | ++    |       | +++      |
| Met M. 595A                                                                     | +           |       |       | +     | +++      |
| Met M. 611A                                                                     | +           | +     | +++   |       | ++       |
| Met M. 612A                                                                     | ++          | ++    |       | +     | ++       |
| Met M. 614A                                                                     |             | ++    |       | ++    | +++      |
| Met M. 616A                                                                     |             |       | +     |       | ++       |
| Met M. 618A                                                                     | +++         | +     |       |       | +++      |
| Met M. 620A                                                                     | ++          | ++    |       | ++    | +++      |
| Met M. 621A                                                                     | +           | +++   |       | +     | +++      |
| Met M. 624A                                                                     |             |       | ++    |       | +++      |
| Met M. 625A                                                                     |             | ++    |       | ++    | +        |
| Met M. 627A                                                                     |             | +     |       | +     | +        |
| Met M. 629A                                                                     | ++          |       |       |       | +++      |
| Met M. 631A                                                                     | +           |       | ++    |       | +        |
| 1255                                                                            | +++         | ++    |       | ++    | ++       |
| 1257                                                                            | +++         | +     | +     | +     | ++       |
| 769                                                                             | +++         |       |       | +     | ++       |
| 1258                                                                            | ++          | +     | +     |       | +        |
| 1259                                                                            |             | ++    | ++    |       | +++      |
| 1250                                                                            | +++         | +     |       | +     | +++      |
| 1726                                                                            | +++         | +     |       | +     | +++      |
| 786                                                                             | +++         | +     | +     |       | +++      |
| 281-LI-r                                                                        | +++         |       |       |       | +++      |
| 289-L2                                                                          | ++          | +     |       |       | ++       |
| 366-S                                                                           | +           |       |       |       | +        |
| 374-S+                                                                          | +++         | ++    |       |       | +++      |
| 376-S                                                                           | ++          |       |       | +     | ++       |
| 381-S                                                                           | +           | +     |       |       | +        |
| 383-Sx                                                                          | +++         | ++    |       |       | +++      |
| 496-M                                                                           | +++         | ++    |       |       | +++      |
| 591-SI-A                                                                        | +           | +     |       |       | +        |
| 652-1                                                                           |             | +     | ++    |       | +++      |
| 772                                                                             | +           |       |       |       | +        |
| 777                                                                             | +           | +     |       | ++    | ++       |
| 778                                                                             | +++         |       |       |       | +++      |
| 779                                                                             | +           |       | ++    |       | ++       |

TABLA 9

| Análisis de 27 tumores primarios de mama por PCR múltiple en tiempo real |             |       |       |       |          |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|-------|-------|----------|
| Muestras de tumor primario de mama                                       | Mamaglobina | B305D | B899P | B726P | Múltiple |
| T443                                                                     | +           | ++    |       | +++   | +++      |
| T457                                                                     |             | +     | +     |       | ++       |
| T395                                                                     |             |       | ++    |       | ++       |
| T10A                                                                     | +           | +++   |       | +++   | +++      |
| T446                                                                     |             | +     |       | ++    | ++       |
| T11C                                                                     | +           |       | +++   |       | +++      |
| T23B                                                                     | +           | ++    |       |       | +++      |
| T207A                                                                    |             | ++    |       |       | +        |
| T437                                                                     | +           | +     |       | ++    | +++      |
| T391                                                                     | +           | ++    |       | +++   | +++      |
| T392                                                                     | +           | +     |       |       | ++       |
| TS76                                                                     | +           | ++    |       |       | +++      |
| T483                                                                     | ++          | +     |       |       | +++      |
| T81G                                                                     | +           | +     | ++    | ++    | +++      |
| T430                                                                     | +           |       | ++    |       | ++       |
| T465                                                                     | +           | +     |       | +     | ++       |
| TS80                                                                     |             |       | +     |       | +        |
| T469                                                                     | +           |       |       | +     | +++      |
| T467                                                                     | +           |       |       | ++    | +++      |
| T439                                                                     |             | +     |       |       | +        |
| T387                                                                     | ++          |       | +     | +     | ++       |
| T318                                                                     |             |       | +     |       | ++       |
| T154A                                                                    |             |       |       | +     | +        |
| T387A                                                                    | +++         |       | +     | +     | +++      |
| T155A                                                                    | +           |       | ++    | +     | +        |
| T209A                                                                    |             | ++    |       |       | ++       |
| T208A                                                                    |             | +     |       | +     | ++       |

A partir de lo precedente se apreciará que, aunque se han descrito aquí realizaciones específicas del invento con fines de ilustración, pueden hacerse diversas modificaciones sin desviarse del alcance del invento. En consecuencia, el invento no está limitado salvo por las reivindicaciones adjuntas.

# REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de una célula de cáncer de mama, método que comprende las operaciones de:

- (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con un primer oligonucleótido que se hibrida con un primer polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en mamaglobina y lipofilina B;
- (b) poner dicha muestra biológica en contacto con un segundo oligonucleótido que se hibrida con una segunda secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia polinucleotídica de GABA $\pi$  (B899P);
- (c) detectar en dicha muestra biológica una cantidad del oligonucleótido hibridado de las operaciones (a) y (b); y
- (d) comparar con un valor de corte predeterminado la cantidad de polinucleótido que se hibrida con los oligonucleótidos de las operaciones (a) y (b) y determinar, a partir de dicha comparación, la presencia o ausencia de un cáncer en el paciente.

2. El método de la Reivindicación 1, en el que dicho primer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 73, ID. SEC. nº 74 e ID. SEC. nº 76, o su complemento; y en el que dicho segundo polinucleótido comprende el polinucleótido expuesto en la ID. SEC. nº 75, o su complemento.

3. El método de la Reivindicación 2, que comprende además:

- (e) poner dicha muestra biológica en contacto con un tercer oligonucleótido que se hibrida con un tercer polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6 e ID. SEC. nº 7, o su complemento; y
- (f) poner dicha muestra biológica en contacto con un cuarto oligonucleótido que se hibrida con un cuarto polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 13, ID. SEC. nº 15, ID. SEC. nº 17, ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23 e ID. SEC. nº 24, o su complemento;

en el que la operación (c) comprende detectar en dicha muestra biológica una cantidad del oligonucleótido hibridado de las operaciones (a), (b), (e) y (f).

4. El método de la Reivindicación 2, que comprende además:

- (e) poner dicha muestra biológica en contacto con un tercer oligonucleótido que se hibrida con un tercer polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 1, ID. SEC. nº 3, ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6 e ID. SEC. nº 7, o su complemento;
- (f) poner dicha muestra biológica en contacto con un cuarto oligonucleótido que se hibrida con un cuarto polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en el polinucleótido representado en la ID. SEC. nº 11, o su complemento;
- (g) poner dicha muestra biológica en contacto con un quinto oligonucleótido que se hibrida con un quinto polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en las ID. SEC. números 13,15 y 17, o su complemento;
- (h) poner dicha muestra biológica en contacto con un sexto oligonucleótido que se hibrida con un sexto polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23 e ID. SEC. nº 24, o su complemento;
- (i) poner dicha muestra biológica en contacto con un séptimo oligonucleótido que se hibrida con un séptimo polinucleótido representado en la ID. SEC. nº 30 o su complemento;
- (j) poner dicha muestra biológica en contacto con un octavo oligonucleótido que se hibrida con un octavo polinucleótido representado en la ID. SEC. nº 32 o su complemento; y
- (k) poner dicha muestra biológica en contacto con un noveno oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido representado en la ID. SEC. nº 76 o su complemento;

en el que la operación (c) comprende detectar en dicha muestra biológica una cantidad del oligonucleótido hibridado de las operaciones (a), (b), (e), (f), (g), (h), (i), (j) y (k).

5. Un método para detectar la presencia de una célula de cáncer de mama, método que comprende las operaciones de:

- 5 (a) poner una muestra biológica, obtenida de un paciente, en contacto con una primera pareja de oligonucleótidos, primera pareja que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido, en el que dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido se hibridan con un primer polinucleótido y con su complemento, respectivamente, y en el que dicho primer polinucleótido comprende mamaglobina o lipofilina B;
- 10 (b) poner dicha muestra biológica en contacto con una segunda pareja de oligonucleótidos, segunda pareja que comprende un tercer oligonucleótido y un cuarto oligonucleótido, en el que dichos oligonucleótidos tercero y cuarto se hibridan con un segundo polinucleótido y con su complemento, respectivamente, y en el que dicho segundo polinucleótido comprende GABA $\pi$  (B899P);
- 15 (c) multiplicar dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido; y
- (d) detectar dicho primer polinucleótido multiplicado y dicho segundo polinucleótido multiplicado;

20 en el que la presencia de dicho primer polinucleótido multiplicado o dicho segundo polinucleótido multiplicado indica la presencia de una célula de cáncer de mama en dicho paciente.

25 6. El método de la Reivindicación 5, en el que dicho primer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 73, ID. SEC. nº 74 e ID. SEC. nº 76, y en el que dicho segundo polinucleótido comprende el polinucleótido expuesto en la ID. SEC. nº 75.

30 7. El método de la Reivindicación 6, que comprende además poner dicha muestra biológica en contacto con una tercera pareja de oligonucleótidos, tercera pareja que comprende un cebador directo y un cebador inverso que se hibridan con un tercer polinucleótido y su complemento, respectivamente, en el que dicho tercer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 5, ID. SEC. nº 6 e ID. SEC. nº 7; en el que la operación (d) comprende además multiplicar dicho tercer polinucleótido; y en el que la operación (e) comprende además detectar dicho tercer polinucleótido.

35 8. El método de la Reivindicación 7, que comprende además poner dicha muestra biológica en contacto con una cuarta pareja de oligonucleótidos, cuarta pareja que comprende un cebador directo y un cebador inverso que se hibridan con un cuarto polinucleótido y su complemento, respectivamente, en el que dicho cuarto polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. nº 13, ID. SEC. nº 15, ID. SEC. nº 17, ID. SEC. nº 19, ID. SEC. nº 20, ID. SEC. nº 21, ID. SEC. nº 22, ID. SEC. nº 23 e ID. SEC. nº 24; en el que la operación (d) comprende además multiplicar dicho cuarto polinucleótido; y en el que la operación (e) comprende además detectar dicho cuarto polinucleótido.

40 9. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-8, en el que dicha muestra biológica es seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero, ganglio linfático, médula ósea, esputo, orina y muestra de biopsia tumoral.

45 10. El método de la Reivindicación 9, en el que dicha muestra biológica es seleccionada del grupo que consiste en sangre, un ganglio linfático y médula ósea.

11. El método de la Reivindicación 9, en el que dicho ganglio linfático es un ganglio linfático centinela.

50 12. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5-8, en el que dichos oligonucleótidos son seleccionados del grupo que consiste en los oligonucleótidos representados en las ID. SEC. números 33-38, 48-51 y 53-62.

13. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5-8, en el que la operación (e) comprende una operación seleccionada del grupo que consiste en detectar un radiomarcador y detectar un fluoróforo.

55 14. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-8, en el que dicha operación de detección comprende una operación de fraccionamiento.

60 15. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5-8, en el que dichos oligonucleótidos son oligonucleótidos que abarcan intrones.

16. El método de la Reivindicación 15, en el que dichos oligonucleótidos que abarcan intrones son seleccionados del grupo que consiste en los oligonucleótidos representados en las ID. SEC. números 36-44 y 48-62.

65 17. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5-8, en el que la detección de dicho polinucleótido primero, segundo, tercero o cuarto multiplicado comprende poner dicho polinucleótido primero, segundo, tercero o cuarto multiplicado en contacto con una sonda oligonucleotídica marcada que se hibrida, bajo condiciones moderadamente rigurosas, con dicho polinucleótido primero, segundo, tercero o cuarto.

18. El método de la Reivindicación 17, en el que dicha sonda oligonucleotídica marcada comprende un resto detectable seleccionado del grupo que consiste en un radiomarcador y un fluoróforo.

19. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-8, que comprende además una operación de enriquecimiento de dicha muestra biológica en cuanto a dicha célula cancerosa antes de la hibridación de dicho(s) cebador(es) oligonucleotídico(s).

20. El método de la Reivindicación 1-8, en el que dicha operación de enriquecimiento de dicha muestra biológica en cuanto a dicha célula cancerosa es llevada a cabo mediante una metodología seleccionada del grupo que consiste en captura celular y agotamiento celular.

21. El método de la Reivindicación 20, en el que la captura celular es llevada a cabo mediante inmunocaptura, inmunocaptura que comprende las operaciones de:

- (a) hacer que un anticuerpo se adsorba a la superficie de dichas células cancerosas; y
- (b) separar dichas células cancerosas con anticuerpo adsorbido, del resto de dicha muestra biológica.

22. El método de la Reivindicación 21, en el que dicho anticuerpo se dirige hacia un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD29, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD66B, CD66e, HLA-DR, IgE y TCR $\alpha\beta$ .

23. El método de la Reivindicación 21, en el que dicho anticuerpo se dirige hacia un antígeno tumoral de mama.

24. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 21-23, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

25. El método de la Reivindicación 21, en el que dicho anticuerpo está conjugado con glóbulos magnéticos.

26. El método de la Reivindicación 21, en el que dicho anticuerpo está formulado en un complejo de anticuerpo tetramero.

27. El método de la Reivindicación 21, en el que el agotamiento celular es llevado a cabo mediante un método que comprende las operaciones de:

- (a) entrecruzar glóbulos rojos y glóbulos blancos; y
- (b) fraccionar dichos glóbulos rojos y blancos entrecruzados del resto de dicha muestra biológica.

28. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5-8, en el que dicha operación de multiplicación es llevada a cabo mediante una metodología de multiplicación de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), PCR inversa, multiplicación rápida de extremos de cDNA (RACE), reacción en cadena de la ligasa (LCR), replicasa de Qbeta, multiplicación isotérmica, multiplicación por desplazamiento de cadenas (SDA), reacción en cadena rodante (RCR), reacción cíclica de sondas (CPR), sistemas de multiplicación basados en transcripción (TAS), multiplicación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) y replicación automantenida de secuencias (3SR).

29. Una composición para detectar una célula de cáncer de mama en una muestra biológica de un paciente, composición que comprende:

- (a) un primer oligonucleótido; y
- (b) un segundo oligonucleótido;

en la que dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido tienen una longitud de al menos 15 nucleótidos y se hibridan específicamente con un primer polinucleótido o su complemento y con un segundo polinucleótido o su complemento, respectivamente; en la que dicho primer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en la ID. SEC. n° 73, ID. SEC. n° 74 e ID. SEC. n° 76; y en la que dicho segundo polinucleótido comprende el polinucleótido expuesto en la ID. SEC. n° 75.

30. La composición de la Reivindicación 29, que comprende además un tercer y un cuarto oligonucleótidos, tercer y cuarto oligonucleótidos que se hibridan con un tercer polinucleótido o su complemento y con un cuarto polinucleótido o su complemento, respectivamente; en la que dicho tercer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6 e ID. SEC. n° 7; y en la que dicho cuarto polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 13, ID. SEC. n° 15, ID. SEC. n° 17, ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23 e ID. SEC. n° 24.



31. La composición de la Reivindicación 30 o la Reivindicación 31, en la que dichos oligonucleótidos son seleccionados del grupo que consiste en oligonucleótidos como los descritos en las ID. SEC. números 33-44, 48-62, y 72.

32. Una composición para detectar una célula de cáncer de mama en una muestra biológica de un paciente, composición que comprende:

(a) una primera pareja de oligonucleótidos; y

(b) una segunda pareja de oligonucleótidos;

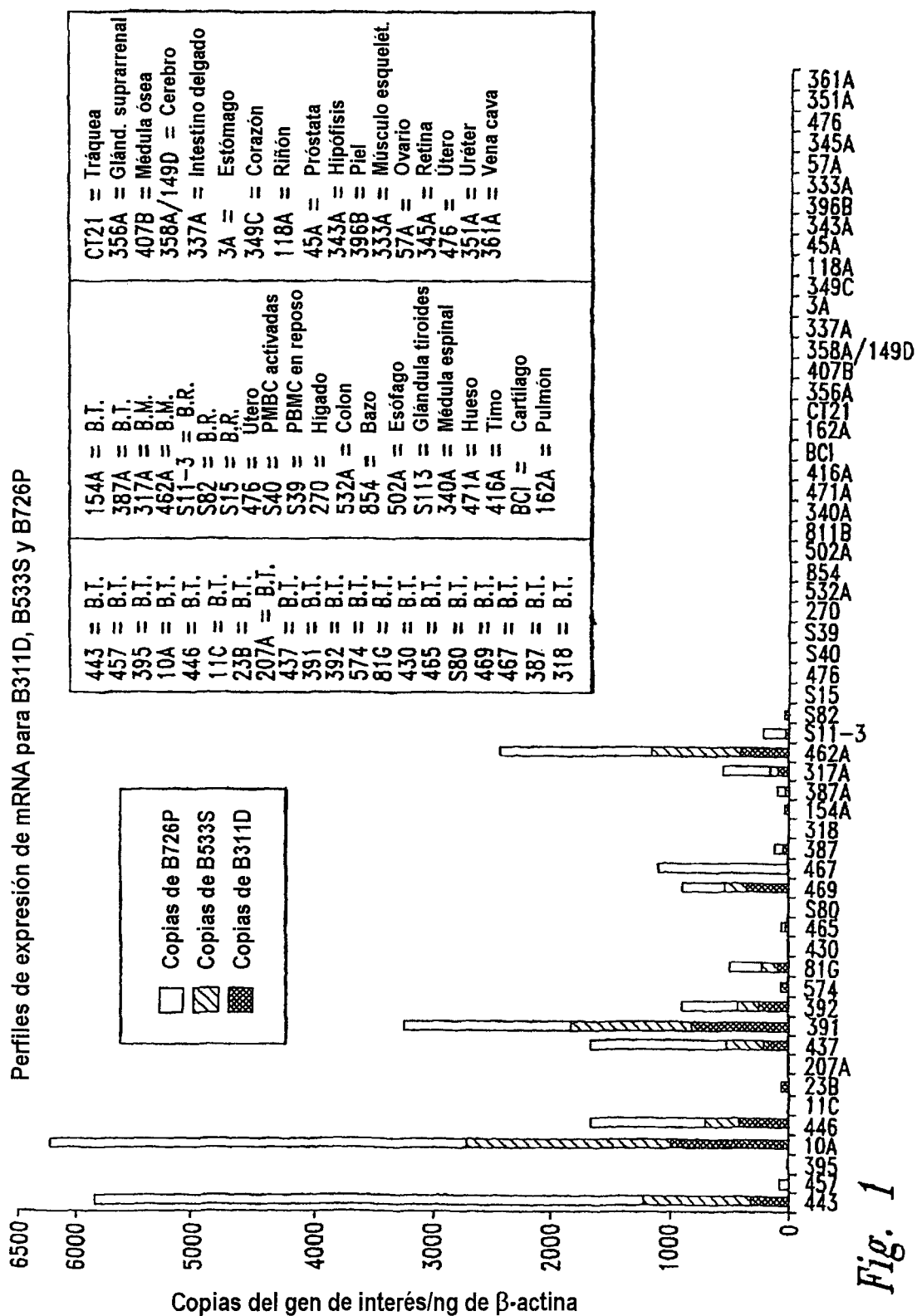
en la que dicha primera pareja de oligonucleótidos y dicha segunda pareja de oligonucleótidos tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos y se hibridan específicamente con un primer polinucleótido o su complemento y con un segundo polinucleótido o su complemento, respectivamente; en la que dicho primer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en la ID. SEC. n° 73, ID. SEC. n° 74 e ID. SEC. n° 76; y en la que dicho segundo polinucleótido comprende el polinucleótido expuesto en la ID. SEC. n° 75.

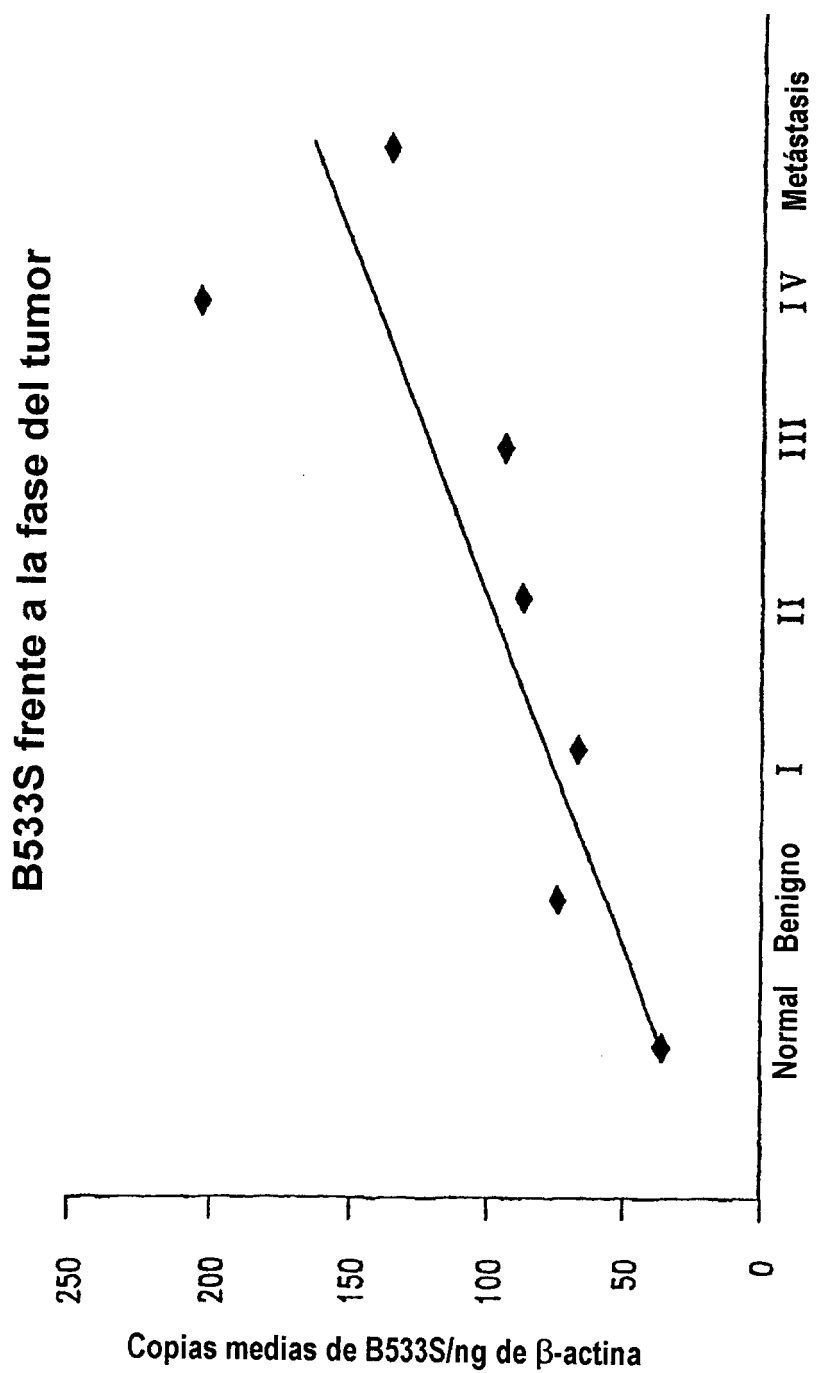
33. La composición de la Reivindicación 32, que comprende además una tercera pareja de oligonucleótidos y una cuarta pareja de oligonucleótidos, tercera pareja de oligonucleótidos y cuarta pareja de oligonucleótidos que se hibridan con un tercer polinucleótido o su complemento y con un cuarto polinucleótido o su complemento, respectivamente; en la que dicho tercer polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 5, ID. SEC. n° 6 e ID. SEC. n° 7; y en la que dicho cuarto polinucleótido es seleccionado del grupo que consiste en los polinucleótidos representados en la ID. SEC. n° 13, ID. SEC. n° 15, ID. SEC. n° 17, ID. SEC. n° 19, ID. SEC. n° 20, ID. SEC. n° 21, ID. SEC. n° 22, ID. SEC. n° 23 e ID. SEC. n° 24.

34. La composición de la Reivindicación 32 o la Reivindicación 33, en la que dichos oligonucleótidos son seleccionados del grupo que consiste en oligonucleótidos como los descritos en las ID. SEC. números 33-44, 48-62, y 72.

35. Un sistema para la detección del cáncer de mama, que incluye la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 29 a 34.

**Fig. 1**





*Fig. 2*

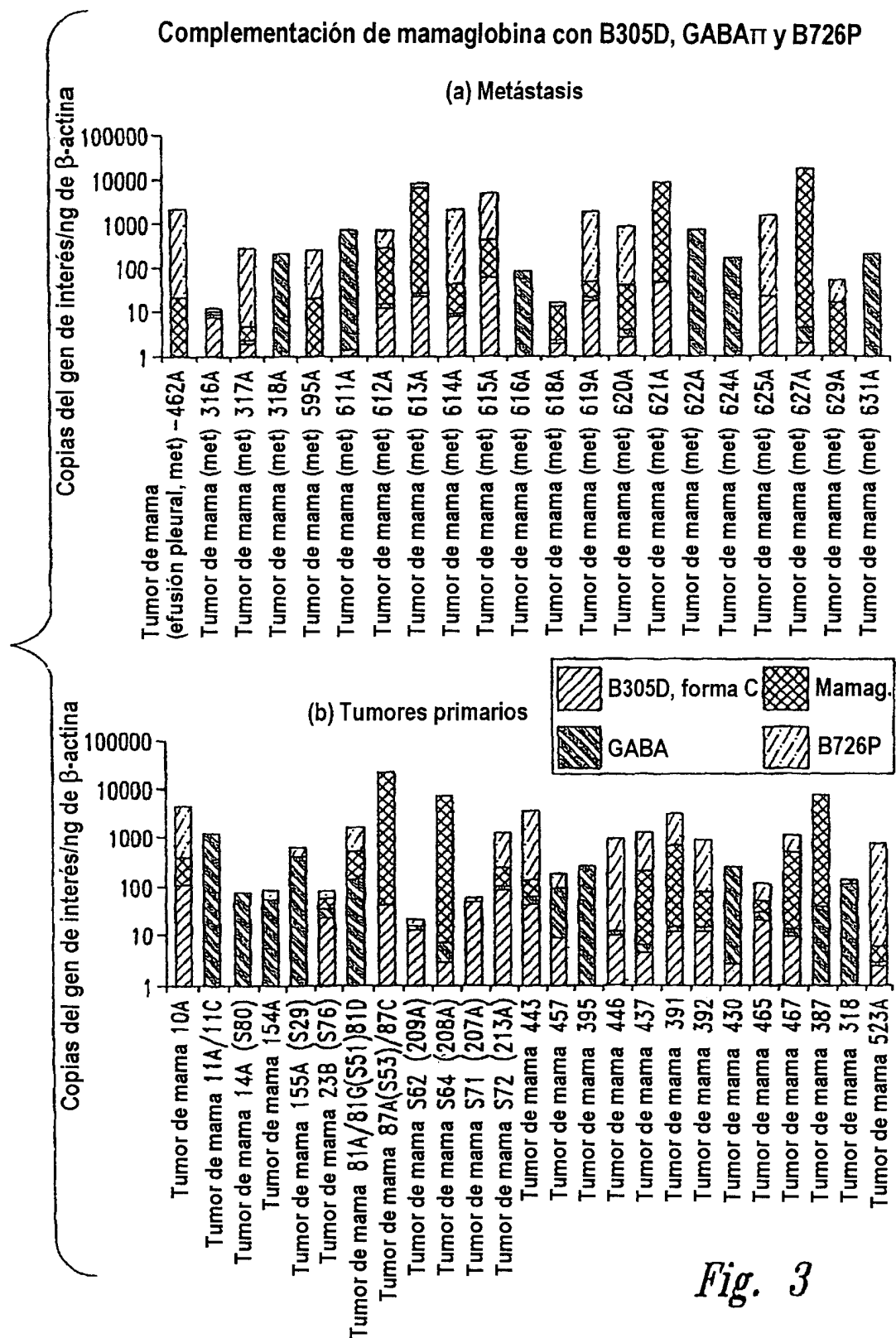


Fig. 3

```

GACAGCGGCTTCCTTGATCCTTGCCACCCGGGACTGAACACCGACAGCAG 50
CAGCCTCACCATGAAGTTGCTGATGGTCCTCATGCTGGCGGCCCTCTCCC 100
AGCACTGCTACGCAGGCTCTGGCTGCCCTTATTGGAGAATGTGATTTC 150
AAGACAATCAATCCACAAGTGTCTAAGACTGAATACAAAGAACTTCTTCA 200
AGAGTTCATAGACGACAATGCCACTACAAATGCCATAGATGAATTGAAGG 250
AATGTTTTCTTAACCAAACGGATGAACTCTGAGCAATGTTGAGGTGTTT 300
CTGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGTGATTATTTAACTTTCTGC 350
AAGACCTTTGGCTCAGAGAACTGCAGGATGAGTGAGAAACCAACTACGG 400
ATTGCTGCAACCACACCTTCTCTTTCTTATGCTTTTTACTACAAACTA 450
CAAGACAATTGTTGAAACCTGCTATACATGTTTATTTAATAAATTGATG 500
GCA 503

```

*Fig. 4*

```

CACTGCTACGCAGGCTCTGGCTGCCCTTATTGGAGAATGTGATTTC 50
GACAATCAATCCACAAGTGTCTAAGACTGAATACAAAGAACTTCTTCAAG 100
AGTTCATAGACGACAATGCCACTACAAATGCCATAGATGAATTGAAGGAA 150
TGTTTTCTTAACCAAACGGATGAACTCTGAGCAATGTTGAGGTGTTTAT 200
GCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGTGATTATTTGGCGGCCATCACC 250
ATCACCATCACTAAGGTCCGAGCTCGAATTCTGCAGATATCCATCACAC 300
T 301

```

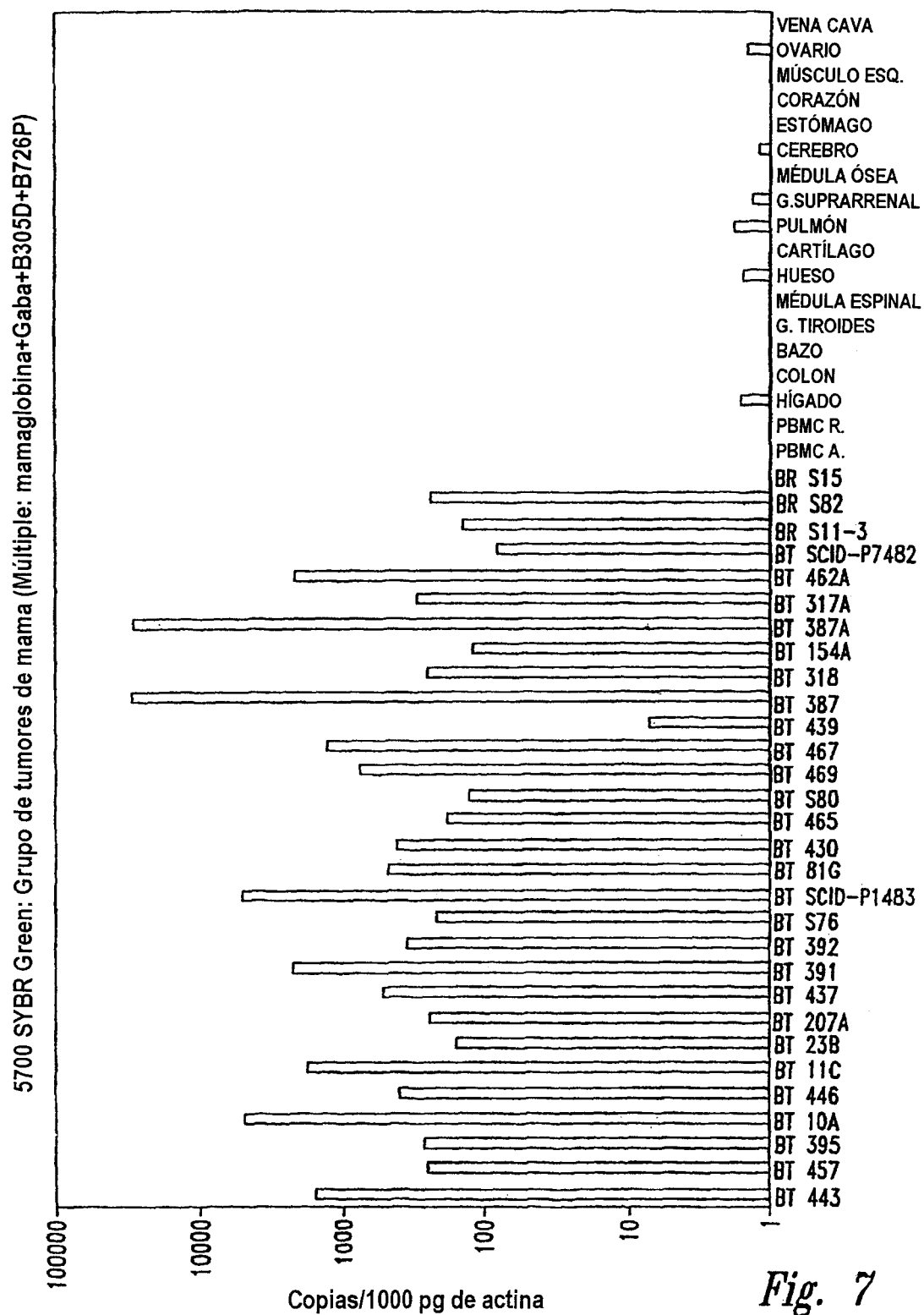
*Fig. 5*

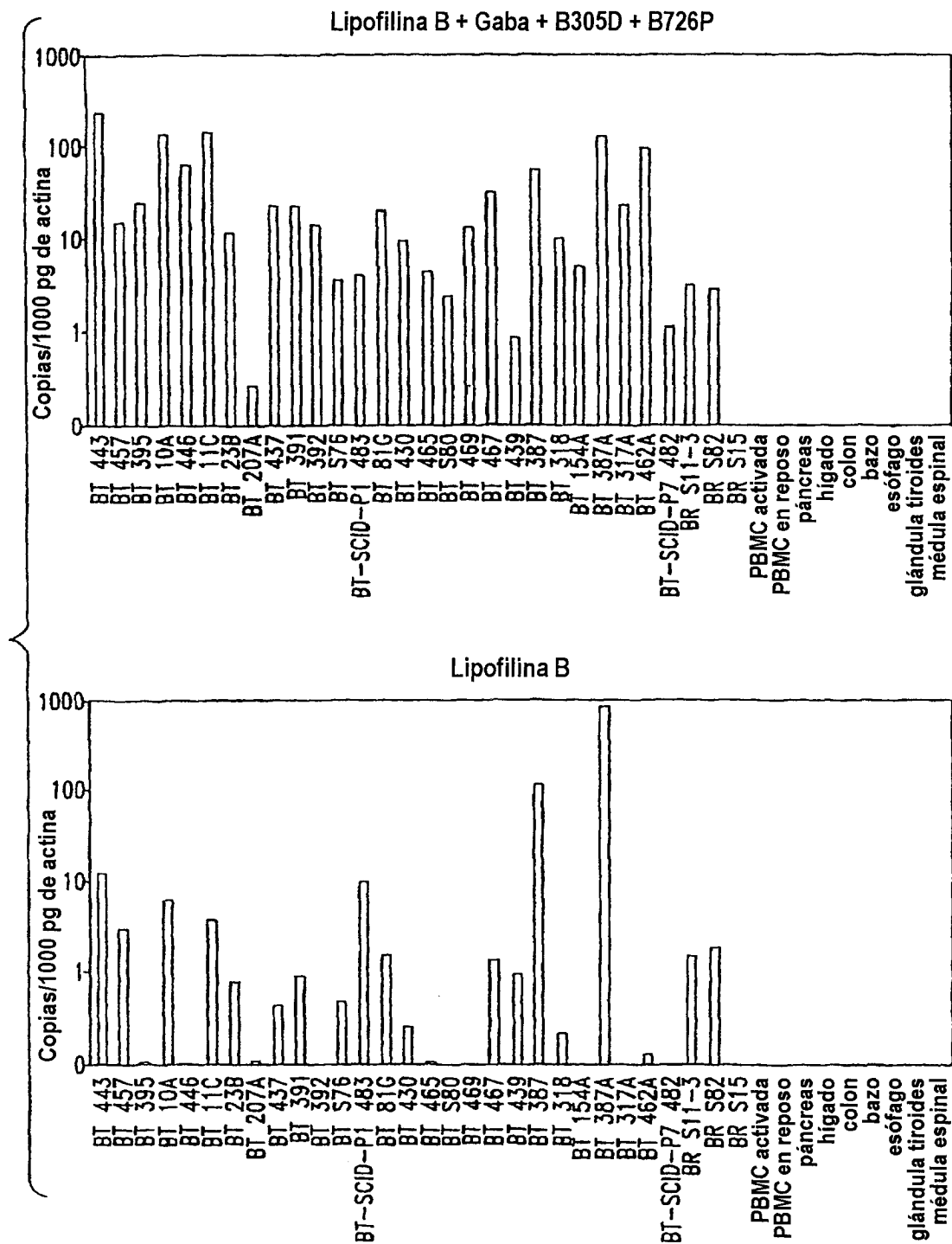
```

GGGACAGGGCTGAGGATGAGGAGAACCCTGGGGACCCAGAAGACCGTGCCCTGCCCGGAAGTCCTGCCCTGTAGGCCTGAAGGACTTGCCTTAACAGAGCC 100
TCAACAACCTACCTGGTGATTCTACTTCAGCCCTTGCTGTGAGCAGCTTCTCAACATGAACCTACAGCCTCCACTTGGCCTTCGTGTGTCTGAGTCTCTT
CACTGAGAGGATGTGCATCCAGGGGAGTCAGTTCAACGTCGAGGTCGGCAGAAAGTGACAAGCTTCCCTGCCCTGGCTTTGAGAACCTCAGAGGAGATAT
AACAAATTTCTCAGGCCAATTTTGGTGGAGAACCCTGACAGATAGCGCTGACTCTGGACATTGCAAGTATCTCTAGCATTTCAGAGAGTAACATGGACT
ACACAGCCACCATATACCTCCGACAGCGCTGGATGGACCAGCGGCTGGTGTGTTGAAGGCAACAAGAGCTTCACCTCGATGCCCGCTCGTGGAGTTCTCT 500
CTGGGTGCCAGATACCTTACATTGTGGAGTCCAAGAAGTCCCTCCCTCATGAAGTCACTGTGGGAAACAGGCTCATCCGCTCTTCTCCAAATGGCAGCGTC
CTGTATGCCCTCAGAATCAGCAACTGTTGCATGTAACATGGATCTGTCTAAATACCCATGGACACACAGACATGCAAGTTGCAGCTGGAAGGCTGGG
GCTATGATGAAATGATGTGGAGTTCACTGGCTGAGAGGGAACGACTCTGTGCGTGGACTGGAACACCTGCGGCTTGTCTCAGTACCCATAGAGCGGTA
TTTCACCTTAGTCACAGATCCGACAGGAGACAGGAAATTAAGTATGATTGGTCTTACAGTTTGAAGTCTCGAGGAATGTTCTGTATTTCAATTTGGAA
ACCTAGCTTCTTCCACTTCTCTGGTGTGTTGTCTGGGTTTCAATTTGGATCTCTCTGATTCAGTCCCTGCAAGAACCTGCATTGGAGTGACGACCG 1000
TGTTATCAATGACCACACTGATGATCGGGTCCCGCACTTCTCTTCCCAACCAACCTGCTTCATCAAGGCCATCGATGTGTACCTGGGATCTGCTTTAG
CTTTGTGTTTGGGGCTTGTCTAGAATATGCAATGCTCTACTACAGTTCTTACAGCAGATGGCAGCCAAAGATAGGGGACAAACAAAGGAGTAGAAGAA
GTCAGTATTACTAATATCATCAACAGCTCCATCTCCAGCTTTAAACGGAAGATCAGCTTGGCAGCATTGAAATTTCCAGCGACAACGTTGACTACAGTG
ACTTGACAATGAAAACAGCGACAAGTTCAAGTTGTCTCCGAGAAAAGATGGGAGGATGTTGATTATTTCACAATTCAAAACCCAGTAATGTTGA
TCCTATTCCAACTACTGTTTCTTTGATTTTATGCTAGCCAAATGATTTTACTGGGCATACTACATGATTTTGGAGTCAATGTTAAATTTCTTGCA 1500
TGCCATAGGCTCTTCAACAGGACAAGATAATGATGTAATGTTATTTAGGCCAAGTGTGACCCACATCCAATGGTGTACAAGTGAAGTGAATATATTT
TGAGTCTTTCTGCTCAAGAATGAAGCTCCAACCATTTGTTCTAAGCTGTGTAGAAGTCTAGCATTATAGGATCTGTGAATAGAACATCAAGTCCATTCC
TCTTTCATCTTAATCAAGACATTTCCATGGAGCCCAAGATTACAATGTACTCAGGCTGTTTATTCCGGTGGCTCCCTGGTTTGCATTACCTCATATA
AAGAATGGGAAGGAGACCATTTGGGTAACCCCTCAAGTGTGAGAAGTGTGTTCTAAAGTAACTATACATGTTTCTTAAATCTCTGCAAGTCTTATAAAA
TACATTGTGCTATTTAGGGAGTAACATTTCTAGTTTGTGTTCTGGTTAAATGAATATGGGCTTATGTCAATTCATTGGAGTCAATGCCTAAC 2000
TCAATACCAAGATGAGTTTTTAAATAATGAATATTATTAATACCACAACAGAATTATCCCAATTTCCAATAAGTCCATCATTTGAAAATTCAAATATA
AGTGAAGAAAAATTAGTAGATCAACAATCTAAACAATCCCTCGGTTCTAAGATACAATGATTCCCATACTGGAAGGACTCTGAGGCTTTATTCCCC
CACTATGCATATCTTATCATTTTATTATATACACACATCCATCCTAACTATACTAAAGCCCTTTCCCATGCATGGATGGAATGGAAGATTTTGTG
TAACTTGTCTAGAACTCTAATATGGGCTGTGTCATGAAGGCTTGAGAAATGAGTCCATTTCTAGCTGCCCTTATTCACATAGTGATGGGTACTA
AAAGTACTGGGTGACTCAGAGAGTCGCTGTCTGTCATTGCTGCTACTCTAAGTGAAGCAACTCTCCAGTGGCAGATCCCTGTATCATTC 2500
AAGAGSAGCATTTCATCCCTTGTCTAATGATCAGGAATGATGCTTATTAGAAAACAACTGCTTGACCCAGGAACAAGTGGCTTAGCTTAAGTAACTT
GGCTTGTCTAGATCCCTGATCCTTCCAGCTGGTCTGCTCTGAGTGGCTTATCCCGCATGAGCAGGAGCGTGTGGCCCTGAGTACTGAACCTTTCTGAGT
AACAATGAGACAGTTACAGAACCTATGTTGAGGTTGGGGTGAGCTGCCCTCTCCAAATCCAGCCAGAGATGCATTCCTCGGCCAGTCTCAGCCAAC
AGTACCAAAAGTGATTTTGGAGTGTCCAGGTTAAAGGCTTCCAGTTGAGCCTCAGTTATTTAGACAATCTGCGCATCTTAAATTTCTAGCTTCTGT
TC1AATAATGCACGGCTTTACCTTCTGTGAGAAATAACCAAGGCTCTAAAGATGATTTCCCTTCTGTAACCTCCAGAGCCACAGGTTCTCATTC 3000
CTTTTCCATTATACCTCTCACAATCAGTTTCTATGAGTTGATCACCTGATTTTAAACAAATAATTTCTAACGGGAATGGGTGGAGTGTCTGTGA
AAAGAGATGAAATGTGGTGTATGAGCCAATCATATTTGTGATTTTTAAAAAAGTTTAAAGGAAATATCTGTTCTGAACCCCACTTAAGCATTGTT
TTATATAAAAAAATGATAAAGATGTGAAGTGTGAATAAATATACCATATTAGCTACCCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3282

```

Fig. 6

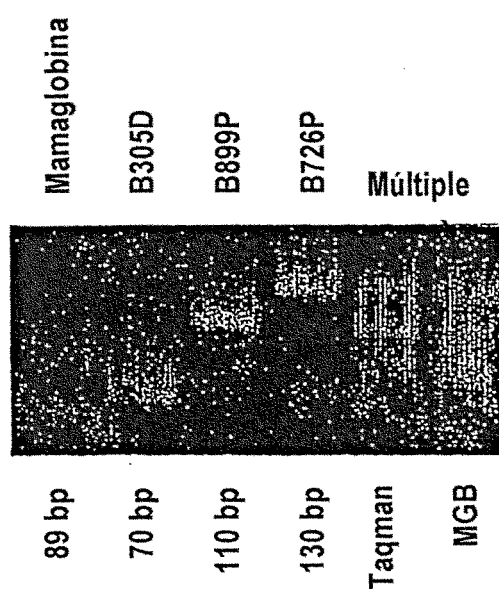




*Fig. 8*



**Ensayo de PCR Múltiple**  
**Determinación génica por tamaño de amplicón**



*Fig. 9*

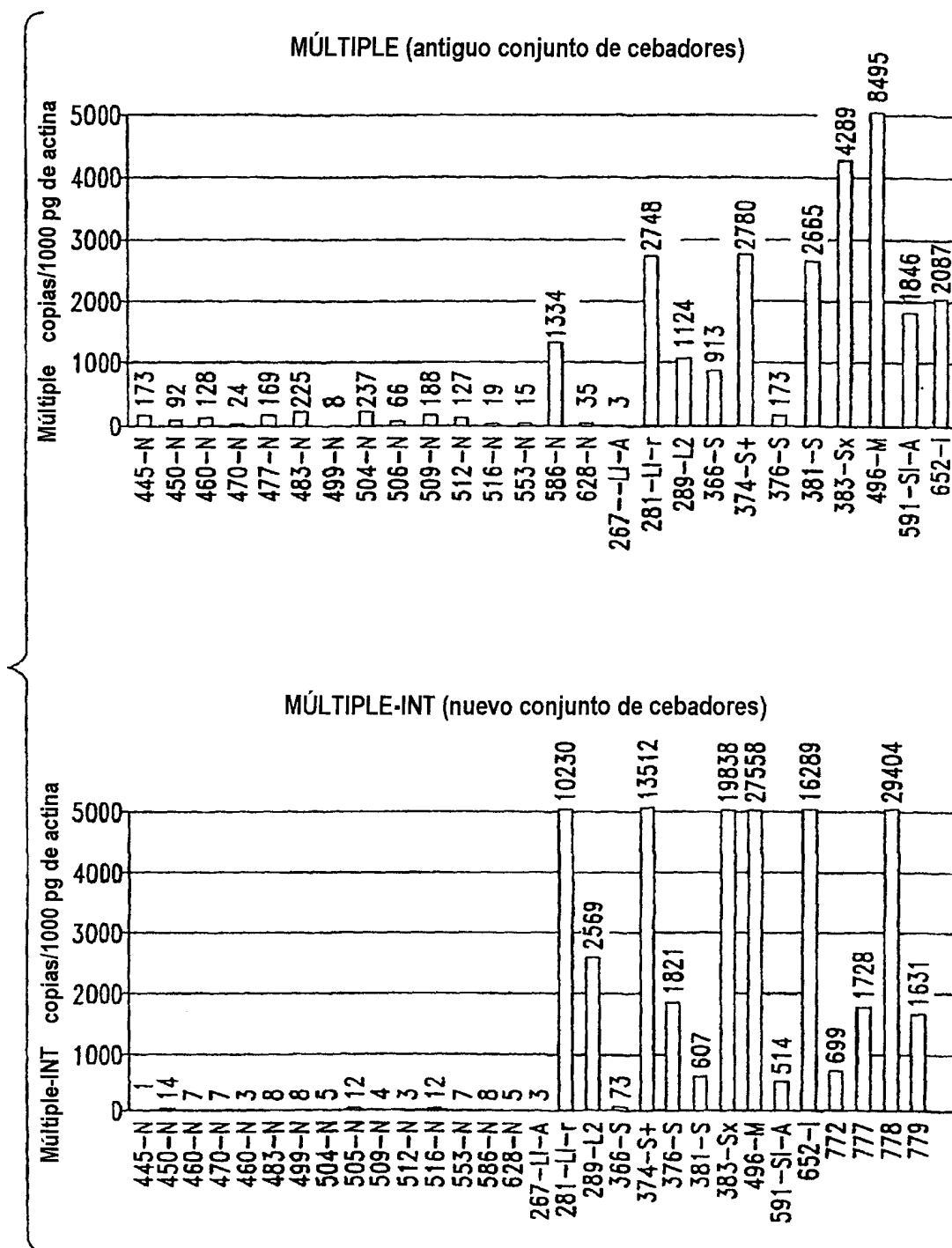


Fig. 10

# ES 2 281 416 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Corixa Corporation  
Houghton, Raymond L.  
Dillon, Davin C.  
Molesh, David A.  
Xu, Jiangchun  
Zehentner, Barbara  
Persing, David H.

<120> MÉTODOS, COMPOSICIONES Y SISTEMAS PARA LA DETECCIÓN Y EL CONTROL DEL CÁNCER DE MAMA

<130> 210121.513PC

<140> PCT

<141> 2001-04-02

<160> 77

<170> FastSEQ para Windows, Versión 3.0

<210> 1

<211> 1851

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

35      tcatcaccat  tgccagcagc  ggcaccgtta  gtcagggtttt  ctgggaatcc  cacatgagta      60
      cttccgtgtt  cttcattctt  cttcaatagc  cataaatctt  ctagctctgg  ctggctgttt      120
      tcacttcttt  taagcctttg  tgactcttcc  tctgatgtca  gctttaagtc  ttgttctgga      180
      ttgctgtttt  cagaagagat  ttttaacatc  tgtttttctt  tgtagtcaga  aagtaactgg      240
      caaattacat  gatgatgact  agaaacagca  tactctctgg  ccgtctttcc  agatcttgag      300
40      aagatacatc  aacattttgc  tcaagtagag  ggctgactat  acttgctgat  ccacaacata      360
      cagcaagtat  gagagcagtt  cttccatata  tatccagcgc  atttaaatcc  gcttttttct      420
      tgattaaaaa  tttcaccact  tgctgttttt  gctcatgtat  accaagtagc  agtgggtgta      480
      ggccatgctt  gttttttgat  tccgatcagc  caccgtataa  gagcagtgct  ttggccatta      540
45      atttatcttc  attgtagaca  gcatagtgta  gagtgggtat  tccatactca  tctggaatat      600
      ttggatcagt  gccatgttcc  agcaacatta  acgcacattc  atcttctctg  cattgtacgg      660
      cctttgtcag  agctgtcttc  tttttgttgt  caaggacatt  aagttgacat  cgtctgtcca      720
      gcacgagttt  tactacttct  gaattcccat  tggcagaggg  cagatgtaga  gcagtcctct      780
      tttgcttgte  cctcttggtc  acatccgtgt  ccctgagcat  gacgatgaga  tcctttctgg      840
50      ggactttacc  ccaccaggca  gctctgtgga  gcttgtccag  atcttctcca  tggacgtggg      900
      acctgggac  catgaaggcg  ctgtcatcgt  agtctcccca  agcgaccacg  ttgctcttgc      960
      cgtcccttg  cagcagggga  agcagtgcca  gcaccacttg  cacctcttgc  tcccaagcgt      1020
      cttcacagag  gagtcgttgt  ggtctccaga  agtgcccacg  ttgctcttgc  cgctccctct      1080
      gtccatccag  ggaggagaaa  atgcaggaaa  tgaaagatgc  atgcacgatg  gtatactcct      1140
55      cagccatcaa  acttctggac  agcaggtcac  ttccagcaag  gtggagaaaag  ctgtccaccc      1200
      acagaggatg  agatccagaa  accacaatat  ccattcaca  acaaacactt  ttcagccaga      1260
      cacaggtact  gaaatcatgt  catctgcggc  aacatggtgg  aacctaccca  atcacacatc      1320
      aagagatgaa  gacactgcag  tatacttgca  caacgtaata  ctcttcatcc  ataacaaaat      1380
      aatataaatt  tcctctggag  ccataatgat  gaactatgaa  ggaagaactc  cccgaagaag      1440
60      ccagtcgcag  agaagccaca  ctgaagctct  gtcctcagcc  atcagcgcca  cggacaggag      1500
      tgtgtttctt  ccccatgtat  gcagcctcaa  gttatcccga  agtcgccgca  gcacacgggt      1560
      gctcctgaga  aacaccccg  ctcttccggt  ctaacacagg  caagtcaata  aatgtgataa      1620
      tcacataaac  agaattaaaa  gcaaagtcac  ataagcatct  caacagacac  agaaaaggca      1680
      ttgacaaaaa  tccagcatcc  ttgtatttat  tgttgacagt  ctcagaggaa  atgcttctaa      1740
      cttttcccca  ttttagtatta  tgttggtgtg  gggcttgtca  taggtggttt  ttattacttt      1800
65      aaggtatgtc  ccttctatgc  ctgttttgct  gaggggttta  attctcgtgc  c      1851

```

# ES 2 281 416 T3

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

10      Met Asp Ile Val Val Ser Gly Ser His Pro Leu Trp Val Asp Ser Phe
        1          5          10          15
      Leu His Leu Ala Gly Ser Asp Leu Leu Ser Arg Ser Leu Met Ala Glu
        20          25          30
15      Glu Tyr Thr Ile Val His Ala Ser Phe Ile Ser Cys Ile Ser Ser Ser
        35          40          45
      Leu Asp Gly Gln Gly Glu Arg Gln Glu Gln Arg Gly His Phe Trp Arg
        50          55          60
20      Pro Gln Arg Leu Leu Cys Glu Asp Ala Trp Glu Gln Glu Val Gln Val
        65          70          75          80
      Val Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Gln Gly Ser Gly Lys Ser Asn Val
        85          90          95
      Val Ala Trp Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Ala Phe Met Asp Pro Arg Tyr
        100          105          110
25      His Val His Gly Glu Asp Leu Asp Lys Leu His Arg Ala Ala Trp Trp
        115          120          125
      Gly Lys Val Pro Arg Lys Asp Leu Ile Val Met Leu Arg Asp Thr Asp
        130          135          140
      Val Asn Lys Arg Asp Lys Gln Lys Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Ser
        145          150          155          160
30      Ala Asn Gly Asn Ser Glu Val Val Lys Leu Val Leu Asp Arg Arg Cys
        165          170          175
      Gln Leu Asn Val Leu Asp Asn Lys Lys Arg Thr Ala Leu Thr Lys Ala
        180          185          190
35      Val Gln Cys Gln Glu Asp Glu Cys Ala Leu Met Leu Leu Glu His Gly
        195          200          205
      Thr Asp Pro Asn Ile Pro Asp Glu Tyr Gly Asn Thr Thr Leu His Tyr
        210          215          220
      Ala Val Tyr Asn Glu Asp Lys Leu Met Ala Lys Ala Leu Leu Leu Tyr
        225          230          235          240
40      Gly Ala Asp Ile Glu Ser Lys Asn Lys His Gly Leu Thr Pro Leu Leu
        245          250          255
      Leu Gly Ile His Glu Gln Lys Gln Gln Val Val Lys Phe Leu Ile Lys
        260          265          270
45      Lys Lys Ala Asn Leu Asn Ala Leu Asp Arg Tyr Gly Arg Thr Ala Leu
        275          280          285
      Ile Leu Ala Val Cys Cys Gly Ser Ala Ser Ile Val Ser Pro Leu Leu
        290          295          300
      Glu Gln Asn Val Asp Val Ser Ser Gln Asp Leu Glu Arg Arg Pro Glu
        305          310          315          320
50      Ser Met Leu Phe Leu Val Ile Ile Met
        325

```

<210> 3

<211> 1852

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 281 416 T3

<400> 3

```

5  ggcacgagaa ttaaaaccct cagcaaaaaca ggcatagaag ggacatacct taaagtaata 60
   aaaaccacct atgacaagcc cacagccaac ataatactaa atggggaaaa gttagaagca 120
   tttcctctga gaactgcaac aataaataca aggatgctgg attttgtcaa atgccttttc 180
   tgtgtctgtt gagatgctta tgtgactttg cttttaattc tgtttatgtg attatcacat 240
   ttattgactt gcctgtgtta gaccggaaga gctgggggtg ttctcaggag ccaccgtgtg 300
   ctgcggcagc ttogggataa cttgaggctg catcactggg gaagaaacac aytccgtgtc 360
10  gtggcgctga tggctgagga cagagcttca gtgtggcttc tctgcgactg gcttcttcgg 420
   ggagtctctc cttcatagtt catccatag gctccagagg aaaattatat tattttgtta 480
   tggatgaaga gtattacgtt gtgcagatat actgcagtgt cttcatctct tgatgtgtga 540
   ttgggtaggt tccaccatgt tgccgcagat gacatgattt cagtacctgt gtctggctga 600
   aaagtgtttg tttgtgaatg gatattgtgg tttctggatc tcatcctctg tgggtggaca 660
15  gctttctcca ccttgctgga agtgacctgc tgtccagaag tttgatggct gaggagtata 720
   ccatcgtgca tgcactcttc atttctgca tttcttcctc cctggatgga cagggggagc 780
   ggcaagagca acgtgggcac ttctggagac cacaacgact cctctgtgaa gacgcttggg 840
   agcaagaggt gcaagtgggt ctgccactgc ttccctctgt gcagggggag cggcaagagc 900
   aacgtggtcg cttggggaga ctacgatgac agcgccctca tggatcccag gtaccacgtc 960
20  catggagaag atctggacaa gctccacaga gctgcctggt ggggtaaaag cccagaaag 1020
   gatctcatcg tcatgtctag ggacacggat gtgaacaaga gggacaagca aaagaggact 1080
   gctctacatc tggcctctgc caatgggaat tcagaagtag taaaactcgt gctggacaga 1140
   cgatgtcaac ttaatgtcct tgacaacaaa aagaggacag ctctgacaaa ggccgtacaa 1200
   tgccaggaag atgaatgtgc gttaatgttg ctggaacatg gcactgatcc aaatattcca 1260
25  gatgagtatg gaaataccac tctacactat gctgtctaca atgaagataa attaatggcc 1320
   aaagcactgc tcttatacgg tgctgatatc gaatcaaaaa acaagcatgg cctcacacca 1380
   ctgctacttg gtatacatga gcaaaaacag caagtgggtg aatttttaat caagaaaaaa 1440
   gcgaatttaa atgctgtgga tagatatgga agaactgtct tcatacttgc tgtatgttgt 1500
   ggatcagcaa gtatagtcag ccctctactt gagcaaaaatg ttgatgtatc ttctcaagat 1560
30  ctggaaagac ggccagagag tatgtctgtt ctagtcatca tcatgtaatt tgccagttac 1620
   tttctgacta caaagaaaaa cagatgttaa aaatctcttc tgaaaacagc aatccagaac 1680
   aagacttaaa gctgacatca gaggaagagt cacaaaggct taaagggaag gaaaacagcc 1740
   agccagagct agaagattta tggctattga agaagaatga agaacacgga agtactcatg 1800
   tgggattccc agaaaacctg actaacggtg ccgctgctgg caatggtgat ga 1852
35

```

<210> 4

<211> 292

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

45  Met His Leu Ser Phe Pro Ala Phe Leu Pro Pro Trp Met Asp Arg Gly
      5                                10                            15

   Ser Gly Lys Ser Asn Val Gly Thr Ser Gly Asp His Asn Asp Ser Ser
50      20                                25                            30

   Val Lys Thr Leu Gly Ser Lys Arg Cys Lys Trp Cys Cys His Cys Phe
      35                                40                            45

55  Pro Cys Cys Arg Gly Ser Gly Lys Ser Asn Val Val Ala Trp Gly Asp
      50                                55                            60

   Tyr Asp Asp Ser Ala Phe Met Asp Pro Arg Tyr His Val His Gly Glu
60      65                                70                            75                            80

   Asp Leu Asp Lys Leu His Arg Ala Ala Trp Trp Gly Lys Val Pro Arg
      85                                90                            95

65

```

# ES 2 281 416 T3

Lys Asp Leu Ile Val Met Leu Arg Asp Thr Asp Val Asn Lys Arg Asp  
 100 105 110  
 Lys Gln Lys Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Ser Ala Asn Gly Asn Ser  
 115 120 125  
 Glu Val Val Lys Leu Val Leu Asp Arg Arg Cys Gln Leu Asn Val Leu  
 130 135 140  
 Asp Asn Lys Lys Arg Thr Ala Leu Thr Lys Ala Val Gln Cys Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Asp Glu Cys Ala Leu Met Leu Leu Glu His Gly Thr Asp Pro Asn Ile  
 165 170 175  
 Pro Asp Glu Tyr Gly Asn Thr Thr Leu His Tyr Ala Val Tyr Asn Glu  
 180 185 190  
 Asp Lys Leu Met Ala Lys Ala Leu Leu Leu Tyr Gly Ala Asp Ile Glu  
 195 200 205  
 Ser Lys Asn Lys His Gly Leu Thr Pro Leu Leu Leu Gly Ile His Glu  
 210 215 220  
 Gln Lys Gln Gln Val Val Lys Phe Leu Ile Lys Lys Lys Ala Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Asn Ala Leu Asp Arg Tyr Gly Arg Thr Ala Leu Ile Leu Ala Val Cys  
 245 250 255  
 Cys Gly Ser Ala Ser Ile Val Ser Pro Leu Leu Glu Gln Asn Val Asp  
 260 265 270  
 Val Ser Ser Gln Asp Leu Glu Arg Arg Pro Glu Ser Met Leu Phe Leu  
 275 280 285  
 Val Ile Ile Met  
 290

40  
 <210> 5  
 <211> 1155  
 <212> DNA  
 45 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 5

50 atggttggttg aggttgattc catgccggct gcctcttctg tgaagaagcc atttggtctc 60  
 aggagcaaga tgggcaagtg gtgctgccgt tgcttcccct gctgcaggga gagcggaag 120  
 agcaacgtgg gcacttcttg agaccacgac gactctgcta tgaagacact caggagcaag 180  
 atgggcaagt ggtgccgcca ctgcttcccc tgctgcaggg ggagtggcaa gagcaacgtg 240  
 55 ggcgcttctg gagaccacga cgactctgct atgaagacac tcaggaacaa gatgggcaag 300  
 tgggtgctgcc actgcttccc ctgctgcagg gggagcgcca agagcaaggt gggcgcttgg 360  
 ggagactacg atgacagtgc cticattggag cccagggtacc acgtccgtgg agaagatctg 420  
 gacaagctcc acagagctgc ctggtggggt aaagtcccca gaaaggatct catcgtcatg 480  
 ctcagggaca ctgacgtgaa caagaaggac aagcaaaaga ggactgctct acatctggcc 540  
 60 tctgccaatg ggaattcaga agtagtaaaa ctctgctgg acagacgatg tcaacttaat 600  
 gtctttgaca acaaaaagag gacagctctg ataaaggccg tacaatgccg ggaagatgaa 660  
 tgtgcgttaa tgttgctgga acatggcact gatccaaata ttccagatga gtatggaaat 720  
 accactctgc actacgtat ctataatgaa gataaattaa tggccaaagc actgctctta 780

# ES 2 281 416 T3

|    |                           |            |            |             |             |             |      |
|----|---------------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
|    | tatggtgctg                | atatcgaatc | aaaaaacaag | catggcctca  | caccactggt  | acttgggtgta | 840  |
|    | catgagcaaa                | aacagcaagt | cgtgaaatct | ttaatcaaga  | aaaagcgaa   | tttaaatgca  | 900  |
|    | ctggatagat                | atggaaggac | tgctctcata | cttgcgtgat  | gttgtggatc  | agcaagtata  | 960  |
| 5  | gtcagccttc                | tacttgagca | aaatattgat | gtatcttctc  | aagatctatc  | tggacagacg  | 1020 |
|    | gccagagagt                | atgctgtttc | tagtcatcat | catgtaattt  | gccagttact  | ttctgactac  | 1080 |
|    | aaagaaaaac                | agatgctaaa | aatctcttct | gaaaacagca  | atccagaaaa  | tgtctcaaga  | 1140 |
|    | accagaaata                | aataa      |            |             |             |             | 1155 |
| 10 | <210> 6                   |            |            |             |             |             |      |
|    | <211> 2000                |            |            |             |             |             |      |
|    | <212> DNA                 |            |            |             |             |             |      |
| 15 | <213> <i>Homo sapiens</i> |            |            |             |             |             |      |
|    | <400> 6                   |            |            |             |             |             |      |
| 20 | atggtgggtg                | aggttgattc | catgccggct | gcctcttctg  | tgaagaagcc  | atttgggtctc | 60   |
|    | aggagcaaga                | tgggcaagtg | gtgctgccgt | tgcttcccct  | gctgcaggga  | gagcggcaag  | 120  |
|    | agcaacgtgg                | gcacttctgg | agaccacgac | gactctgcta  | tgaagacact  | caggagcaag  | 180  |
|    | atgggcaagt                | ggtgccgcca | ctgcttcccc | tgctgcaggg  | ggagtggcaa  | gagcaacgtg  | 240  |
| 25 | ggcgcttctg                | gagaccacga | cgactctgct | atgaagacac  | tcaggaacaa  | gatgggcaag  | 300  |
|    | tggtgctgcc                | actgcttccc | ctgctgcagg | gggagcggca  | agagcaagggt | ggcgcttgg   | 360  |
|    | ggagactacg                | atgacagtgc | cttcatggag | cccagggtacc | acgtccgtgg  | agaagatctg  | 420  |
|    | gacaagctcc                | acagagctgc | ctggtggggg | aaagtcccca  | gaaaggatct  | catcgtcatg  | 480  |
|    | ctcagggaca                | ctgacgtgaa | caagaaggac | aagcaaaaga  | ggactgctct  | acatctggcc  | 540  |
| 30 | tctgccaatg                | ggaattcaga | agtagtaaaa | ctectgctgg  | acagacgatg  | tcaacttaat  | 600  |
|    | gtccttgaca                | acaaaaagag | gacagctctg | ataaaggccg  | tacaatgcc   | ggaagtga    | 660  |
|    | tgctgcttaa                | tggtgctgga | acatggcact | gatccaaata  | ttccagatga  | gtatggaaat  | 720  |
|    | accactctgc                | actacgctat | ctataatgaa | gataaattaa  | tggccaaagc  | actgctctta  | 780  |
|    | tatggtgctg                | atatcgaatc | aaaaaacaag | catggcctca  | caccactggt  | acttgggtgta | 840  |
| 35 | catgagcaaa                | aacagcaagt | cgtgaaatct | ttaatcaaga  | aaaagcgaa   | tttaaatgca  | 900  |
|    | ctggatagat                | atggaaggac | tgctctcata | cttgcgtgat  | gttgtggatc  | agcaagtata  | 960  |
|    | gtcagccttc                | tacttgagca | aaatattgat | gtatcttctc  | aagatctatc  | tggacagacg  | 1020 |
|    | gccagagagt                | atgctgtttc | tagtcatcat | catgtaattt  | gccagttact  | ttctgactac  | 1080 |
|    | aaagaaaaac                | agatgctaaa | aatctcttct | gaaaacagca  | atccagaaca  | agacttaag   | 1140 |
| 40 | ctgacatcag                | aggaagagtc | acaaagggtc | aaaggcagtg  | aaaatagcca  | gccagagaaa  | 1200 |
|    | atgtctcaag                | aaccagaaat | aaataaggat | ggtgatagag  | aggttgaaga  | agaaatgaag  | 1260 |
|    | aagcatgaaa                | gtaataatgt | gggattacta | gaaaacctga  | ctaattggtgt | cactgctggc  | 1320 |
|    | aattggtgata               | atggattaat | tcctcaaagg | aagagcagaa  | cacctgaaaa  | tcagcaattt  | 1380 |
|    | cctgacaacg                | aaagtgaaga | gtatcacaga | atttgcgaat  | tagtttctga  | ctacaaagaa  | 1440 |
| 45 | aaacagatgc                | caaaatactc | ttctgaaaac | agcaaccag   | aacaagactt  | aaagctgaca  | 1500 |
|    | tcagaggaag                | agtcacaaag | gcttgagggc | agtgaataatg | gccagccaga  | gctagaaaat  | 1560 |
|    | tttatggcta                | tcgaagaaat | gaagaagcac | ggaagtactc  | atgtcggatt  | cccagaaaac  | 1620 |
|    | ctgactaatg                | gtgccactgc | tggcaatggt | gatgatggat  | taattcctcc  | aaggaagagc  | 1680 |
|    | agaacacctg                | aaagccagca | atttcctgac | actgagaatg  | aagagtatca  | cagtgcagaa  | 1740 |
| 50 | caaaatgata                | ctcagaagca | attttgtgaa | gaacagaaca  | ctggaatatt  | acacgatgag  | 1800 |
|    | attctgattc                | atgaagaaaa | gcagatagaa | gtggttgaaa  | aaatgaattc  | tgagctttct  | 1860 |
|    | cttagttgta                | agaaagaaaa | agacatcttg | catgaaaata  | gtacgttgcg  | ggaagaaatt  | 1920 |
|    | gccatgctaa                | gactggagct | agacacaatg | aaacatcaga  | gccagctaaa  | aaaaaaaaaa  | 1980 |
|    | aaaaaaaaaa                | aaaaaaaaaa |            |             |             |             | 2000 |
| 55 | <210> 7                   |            |            |             |             |             |      |
|    | <211> 2040                |            |            |             |             |             |      |
| 60 | <212> DNA                 |            |            |             |             |             |      |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i> |            |            |             |             |             |      |
| 65 |                           |            |            |             |             |             |      |

# ES 2 281 416 T3

<400> 7

|    |             |            |             |             |             |             |      |
|----|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
|    | atggtggttg  | aggttgattc | catgccgget  | gcctcttctg  | tgaagaagcc  | atttggcttc  | 60   |
|    | aggagcaaga  | tgggcaagt  | gtgctgccgt  | tgttccct    | gctgcaggga  | gagcggaag   | 120  |
| 5  | agcaacgtgg  | gcacttctgg | agaccacgac  | gactctgcta  | tgaagacact  | caggagcaag  | 180  |
|    | atgggcaagt  | ggtgccgcca | ctgcttcccc  | tgtgcagg    | ggagtggcaa  | gagcaacgtg  | 240  |
|    | ggcgcttctg  | gagaccacga | cgactctgct  | atgaagacac  | tcaggaacaa  | gatgggcaag  | 300  |
|    | tgggtgctgcc | actgcttccc | ctgctgcagg  | gggagcgga   | agagcaaggt  | gggcgcttgg  | 360  |
|    | ggagactacg  | atgacagtgc | cttcatggag  | cccagggtacc | acgtccgtgg  | agaagatctg  | 420  |
| 10 | gacaagctcc  | acagagctgc | ctgggtgggt  | aaagtcccca  | gaaaggatct  | catcgctcatg | 480  |
|    | ctcagggaca  | ctgacgtgaa | caagaaggac  | aagcaaaaaga | ggactgctct  | acatctggcc  | 540  |
|    | tctgccaatg  | ggaattcaga | agtagtaaaa  | ctcctgctgg  | acagacgatg  | tcaacttaat  | 600  |
|    | gtccttgaca  | acaaaaagag | gacagctctg  | ataaaggccg  | tacaatgcc   | ggaagatgaa  | 660  |
|    | tgtgcgttaa  | tggtgctgga | acatggcact  | gatccaaata  | ttccagatga  | gtatggaaat  | 720  |
| 15 | accactctgc  | actacgctat | ctataatgaa  | gataaattaa  | tggccaaagc  | actgctctta  | 780  |
|    | tatggtgctg  | atatcgaatc | aaaaaacaag  | catggcctca  | caccactgtt  | acttgggtgta | 840  |
|    | catgagcaaa  | aacagcaagt | cgtgaaattt  | ttaatcaaga  | aaaaagcgaa  | tttaaagtca  | 900  |
|    | ctggatagat  | atggaaggac | tgtctcata   | cttgctgtat  | gttggtggatc | agcaagtata  | 960  |
|    | gtcagccttc  | tacttgagca | aaatattgat  | gtatcttctc  | aagatctatc  | tggacagacg  | 1020 |
| 20 | gccagagagt  | atgctgtttc | tagtcatcat  | catgtaattt  | gccagttact  | ttctgactac  | 1080 |
|    | aaagaaaaac  | agatgctaaa | aatctcttct  | gaaaacagca  | atccagaaca  | agacttaag   | 1140 |
|    | ctgacatcag  | aggaagagtc | acaaagggttc | aaaggcagtg  | aaaatagcca  | gccagagaaa  | 1200 |
|    | atgtctcaag  | aaccagaaat | aaataaggat  | ggtgatagag  | aggttgaaga  | agaaatgaag  | 1260 |
|    | aaagcatgaaa | gtaataatgt | gggattacta  | gaaaacctga  | ctaattggtgt | cactgctggc  | 1320 |
| 25 | aatggtgata  | atggattaat | tcctcaaagg  | aagagcagaa  | cacctgaaaa  | tcagcaattt  | 1380 |
|    | cctgacaacg  | aaagtgaaga | gtatcacaga  | atttgcgaa   | tagtttctga  | ctacaaagaa  | 1440 |
|    | aaacagatgc  | caaaatactc | ttctgaaaac  | agcaaccag   | aacaagactt  | aaagctgaca  | 1500 |
|    | tcagaggaag  | agtcacaaag | gcttgagggc  | agtgaaaatg  | gccagccaga  | gaaaagatct  | 1560 |
|    | caagaaccag  | aaataaataa | ggatggtgat  | agagagctag  | aaaattttat  | ggctatcgaa  | 1620 |
| 30 | gaaatgaaga  | agcacggaag | tactcatgtc  | ggattcccag  | aaaacctgac  | taatggtgcc  | 1680 |
|    | actgctggca  | atggtgatga | tggattaatt  | cctccaagga  | agagcagaac  | acctgaaagc  | 1740 |
|    | cagcaatttc  | ctgacactga | gaatgaagag  | tatcacagtg  | acgaacaaaa  | tgatactcag  | 1800 |
|    | aagcaatttt  | gtgaagaaca | gaacactgga  | atattacacg  | atgagattct  | gattcatgaa  | 1860 |
|    | gaaaagcaga  | tagaagtggg | tgaaaaaatg  | aattctgagc  | tttctcttag  | ttgtaagaaa  | 1920 |
| 35 | gaaaaagaca  | tcttgcatga | aaatagtagc  | ttgcgggaag  | aaattgccat  | gctaagactg  | 1980 |
|    | gagctagaca  | caatgaaaca | tcagagccag  | ctaaaaaaa   | aaaaaaaaa   | aaaaaaaaa   | 2040 |

<210> 8

40 <211> 384

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 8

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Met | Val | Val | Glu | Val | Asp | Ser | Met | Pro | Ala | Ala | Ser | Ser | Val | Lys | Lys |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    | Pro | Phe | Gly | Leu | Arg | Ser | Lys | Met | Gly | Lys | Trp | Cys | Cys | Arg | Cys | Phe |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 50 | Pro | Cys | Cys | Arg | Glu | Ser | Gly | Lys | Ser | Asn | Val | Gly | Thr | Ser | Gly | Asp |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|    | His | Asp | Asp | Ser | Ala | Met | Lys | Thr | Leu | Arg | Ser | Lys | Met | Gly | Lys | Trp |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| 55 | Cys | Arg | His | Cys | Phe | Pro | Cys | Cys | Arg | Gly | Ser | Gly | Lys | Ser | Asn | Val |
|    |     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
|    | Gly | Ala | Ser | Gly | Asp | His | Asp | Asp | Ser | Ala | Met | Lys | Thr | Leu | Arg | Asn |
|    |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|    | Lys | Met | Gly | Lys | Trp | Cys | Cys | His | Cys | Phe | Pro | Cys | Cys | Arg | Gly | Ser |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| 60 | Gly | Lys | Ser | Lys | Val | Gly | Ala | Trp | Gly | Asp | Tyr | Asp | Asp | Ser | Ala | Phe |
|    |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
|    | Met | Glu | Pro | Arg | Tyr | His | Val | Arg | Gly | Glu | Asp | Leu | Asp | Lys | Leu | His |
|    |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| 65 | Arg | Ala | Ala | Trp | Trp | Gly | Lys | Val | Pro | Arg | Lys | Asp | Leu | Ile | Val | Met |
|    |     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |



# ES 2 281 416 T3

5 Leu Arg Asp Thr Asp Val Asn Lys Lys Asp Lys Gln Lys Arg Thr Ala  
 165 170 175  
 Leu His Leu Ala Ser Ala Asn Gly Asn Ser Glu Val Val Lys Leu Leu  
 180 185 190  
 Leu Asp Arg Arg Cys Gln Leu Asn Val Leu Asp Asn Lys Lys Arg Thr  
 195 200 205  
 Ala Leu Ile Lys Ala Val Gln Cys Gln Glu Asp Glu Cys Ala Leu Met  
 210 215 220  
 10 Leu Leu Glu His Gly Thr Asp Pro Asn Ile Pro Asp Glu Tyr Gly Asn  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Leu His Tyr Ala Ile Tyr Asn Glu Asp Lys Leu Met Ala Lys  
 245 250 255  
 Ala Leu Leu Leu Tyr Gly Ala Asp Ile Glu Ser Lys Asn Lys His Gly  
 260 265 270  
 15 Leu Thr Pro Leu Leu Leu Gly Val His Glu Gln Lys Gln Gln Val Val  
 275 280 285  
 Lys Phe Leu Ile Lys Lys Lys Ala Asn Leu Asn Ala Leu Asp Arg Tyr  
 290 295 300  
 20 Gly Arg Thr Ala Leu Ile Leu Ala Val Cys Cys Gly Ser Ala Ser Ile  
 305 310 315 320  
 Val Ser Leu Leu Leu Glu Gln Asn Ile Asp Val Ser Ser Gln Asp Leu  
 325 330 335  
 Ser Gly Gln Thr Ala Arg Glu Tyr Ala Val Ser Ser His His His Val  
 340 345 350  
 25 Ile Cys Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Lys Glu Lys Gln Met Leu Lys Ile  
 355 360 365  
 Ser Ser Glu Asn Ser Asn Pro Glu Asn Val Ser Arg Thr Arg Asn Lys  
 370 375 380

<210> 9

<211> 656

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

# ES 2 281 416 T3

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |
|    | Leu | Asp | Arg | Arg | Cys | Gln | Leu | Asn | Val | Leu | Asp | Asn | Lys | Lys | Arg | Thr |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| 5  | Ala | Leu | Ile | Lys | Ala | Val | Gln | Cys | Gln | Glu | Asp | Glu | Cys | Ala | Leu | Met |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|    | Leu | Leu | Glu | His | Gly | Thr | Asp | Pro | Asn | Ile | Pro | Asp | Glu | Tyr | Gly | Asn |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
|    | Thr | Thr | Leu | His | Tyr | Ala | Ile | Tyr | Asn | Glu | Asp | Lys | Leu | Met | Ala | Lys |
| 10 |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
|    | Ala | Leu | Leu | Leu | Tyr | Gly | Ala | Asp | Ile | Glu | Ser | Lys | Asn | Lys | His | Gly |
|    |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
|    | Leu | Thr | Pro | Leu | Leu | Leu | Gly | Val | His | Glu | Gln | Lys | Gln | Gln | Val | Val |
|    |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| 15 | Lys | Phe | Leu | Ile | Lys | Lys | Lys | Ala | Asn | Leu | Asn | Ala | Leu | Asp | Arg | Tyr |
|    |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
|    | Gly | Arg | Thr | Ala | Leu | Ile | Leu | Ala | Val | Cys | Cys | Gly | Ser | Ala | Ser | Ile |
|    | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
|    | Val | Ser | Leu | Leu | Leu | Glu | Gln | Asn | Ile | Asp | Val | Ser | Ser | Gln | Asp | Leu |
| 20 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |
|    | Ser | Gly | Gln | Thr | Ala | Arg | Glu | Tyr | Ala | Val | Ser | Ser | His | His | His | Val |
|    |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
|    | Ile | Cys | Gln | Leu | Leu | Ser | Asp | Tyr | Lys | Glu | Lys | Gln | Met | Leu | Lys | Ile |
|    |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| 25 | Ser | Ser | Glu | Asn | Ser | Asn | Pro | Glu | Gln | Asp | Leu | Lys | Leu | Thr | Ser | Glu |
|    |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
|    | Glu | Glu | Ser | Gln | Arg | Phe | Lys | Gly | Ser | Glu | Asn | Ser | Gln | Pro | Glu | Lys |
|    | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
|    | Met | Ser | Gln | Glu | Pro | Glu | Ile | Asn | Lys | Asp | Gly | Asp | Arg | Glu | Val | Glu |
| 30 |     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
|    | Glu | Glu | Met | Lys | Lys | His | Glu | Ser | Asn | Asn | Val | Gly | Leu | Leu | Glu | Asn |
|    |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
|    | Leu | Thr | Asn | Gly | Val | Thr | Ala | Gly | Asn | Gly | Asp | Asn | Gly | Leu | Ile | Pro |
|    |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| 35 | Gln | Arg | Lys | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Asn | Gln | Gln | Phe | Pro | Asp | Asn | Glu |
|    |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
|    | Ser | Glu | Glu | Tyr | His | Arg | Ile | Cys | Glu | Leu | Val | Ser | Asp | Tyr | Lys | Glu |
|    | 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
|    | Lys | Gln | Met | Pro | Lys | Tyr | Ser | Ser | Glu | Asn | Ser | Asn | Pro | Glu | Gln | Asp |
| 40 |     |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |
|    | Leu | Lys | Leu | Thr | Ser | Glu | Glu | Glu | Ser | Gln | Arg | Leu | Glu | Gly | Ser | Glu |
|    |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
|    | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Leu | Glu | Asn | Phe | Met | Ala | Ile | Glu | Glu | Met | Lys |
|    |     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| 45 | Lys | His | Gly | Ser | Thr | His | Val | Gly | Phe | Pro | Glu | Asn | Leu | Thr | Asn | Gly |
|    |     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
|    | Ala | Thr | Ala | Gly | Asn | Gly | Asp | Asp | Gly | Leu | Ile | Pro | Pro | Arg | Lys | Ser |
|    | 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
|    | Arg | Thr | Pro | Glu | Ser | Gln | Gln | Phe | Pro | Asp | Thr | Glu | Asn | Glu | Glu | Tyr |
| 50 |     |     |     |     | 565 |     |     |     |     |     | 570 |     |     |     | 575 |     |
|    | His | Ser | Asp | Glu | Gln | Asn | Asp | Thr | Gln | Lys | Gln | Phe | Cys | Glu | Glu | Gln |
|    |     |     | 580 |     |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
|    | Asn | Thr | Gly | Ile | Leu | His | Asp | Glu | Ile | Leu | Ile | His | Glu | Glu | Lys | Gln |
|    |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| 55 | Ile | Glu | Val | Val | Glu | Lys | Met | Asn | Ser | Glu | Leu | Ser | Leu | Ser | Cys | Lys |
|    |     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |     |
|    | Lys | Glu | Lys | Asp | Ile | Leu | His | Glu | Asn | Ser | Thr | Leu | Arg | Glu | Glu | Ile |
|    | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
|    | Ala | Met | Leu | Arg | Leu | Glu | Leu | Asp | Thr | Met | Lys | His | Gln | Ser | Gln | Leu |
| 60 |     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |

<210> 10

<211> 671

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 281 416 T3

<400> 10

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5  | Met | Val | Val | Glu | Val | Asp | Ser | Met | Pro | Ala | Ala | Ser | Ser | Val | Lys | Lys |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    | Pro | Phe | Gly | Leu | Arg | Ser | Lys | Met | Gly | Lys | Trp | Cys | Cys | Arg | Cys | Phe |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
|    | Pro | Cys | Cys | Arg | Glu | Ser | Gly | Lys | Ser | Asn | Val | Gly | Thr | Ser | Gly | Asp |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| 10 | His | Asp | Asp | Ser | Ala | Met | Lys | Thr | Leu | Arg | Ser | Lys | Met | Gly | Lys | Trp |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|    | Cys | Arg | His | Cys | Phe | Pro | Cys | Cys | Arg | Gly | Ser | Gly | Lys | Ser | Asn | Val |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
|    | Gly | Ala | Ser | Gly | Asp | His | Asp | Asp | Ser | Ala | Met | Lys | Thr | Leu | Arg | Asn |
| 15 |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|    | Lys | Met | Gly | Lys | Trp | Cys | Cys | His | Cys | Phe | Pro | Cys | Cys | Arg | Gly | Ser |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|    | Gly | Lys | Ser | Lys | Val | Gly | Ala | Trp | Gly | Asp | Tyr | Asp | Asp | Ser | Ala | Phe |
|    |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 20 | Met | Glu | Pro | Arg | Tyr | His | Val | Arg | Gly | Glu | Asp | Leu | Asp | Lys | Leu | His |
|    |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
|    | Arg | Ala | Ala | Trp | Trp | Gly | Lys | Val | Pro | Arg | Lys | Asp | Leu | Ile | Val | Met |
|    | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
|    | Leu | Arg | Asp | Thr | Asp | Val | Asn | Lys | Lys | Asp | Lys | Gln | Lys | Arg | Thr | Ala |
| 25 |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|    | Leu | His | Leu | Ala | Ser | Ala | Asn | Gly | Asn | Ser | Glu | Val | Val | Lys | Leu | Leu |
|    |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |
|    | Leu | Asp | Arg | Arg | Cys | Gln | Leu | Asn | Val | Leu | Asp | Asn | Lys | Lys | Arg | Thr |
|    |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| 30 | Ala | Leu | Ile | Lys | Ala | Val | Gln | Cys | Gln | Glu | Asp | Glu | Cys | Ala | Leu | Met |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|    | Leu | Leu | Glu | His | Gly | Thr | Asp | Pro | Asn | Ile | Pro | Asp | Glu | Tyr | Gly | Asn |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
|    | Thr | Thr | Leu | His | Tyr | Ala | Ile | Tyr | Asn | Glu | Asp | Lys | Leu | Met | Ala | Lys |
| 35 |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
|    | Ala | Leu | Leu | Leu | Tyr | Gly | Ala | Asp | Ile | Glu | Ser | Lys | Asn | Lys | His | Gly |
|    |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     |     | 270 |     |     |
|    | Leu | Thr | Pro | Leu | Leu | Leu | Gly | Val | His | Glu | Gln | Lys | Gln | Gln | Val | Val |
|    |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| 40 | Lys | Phe | Leu | Ile | Lys | Lys | Lys | Ala | Asn | Leu | Asn | Ala | Leu | Asp | Arg | Tyr |
|    |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
|    | Gly | Arg | Thr | Ala | Leu | Ile | Leu | Ala | Val | Cys | Cys | Gly | Ser | Ala | Ser | Ile |
|    | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |
|    | Val | Ser | Leu | Leu | Leu | Glu | Gln | Asn | Ile | Asp | Val | Ser | Ser | Gln | Asp | Leu |
| 45 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
|    | Ser | Gly | Gln | Thr | Ala | Arg | Glu | Tyr | Ala | Val | Ser | Ser | His | His | His | Val |
|    |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |     |
|    | Ile | Cys | Gln | Leu | Leu | Ser | Asp | Tyr | Lys | Glu | Lys | Gln | Met | Leu | Lys | Ile |
|    |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| 50 | Ser | Ser | Glu | Asn | Ser | Asn | Pro | Glu | Gln | Asp | Leu | Lys | Leu | Thr | Ser | Glu |
|    |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
|    | Glu | Glu | Ser | Gln | Arg | Phe | Lys | Gly | Ser | Glu | Asn | Ser | Gln | Pro | Glu | Lys |
|    | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |

# ES 2 281 416 T3

5 Met Ser Gln Glu Pro Glu Ile Asn Lys Asp Gly Asp Arg Glu Val Glu  
 405 410 415  
 Glu Glu Met Lys Lys His Glu Ser Asn Asn Val Gly Leu Leu Glu Asn  
 420 425 430  
 Leu Thr Asn Gly Val Thr Ala Gly Asn Gly Asp Asn Gly Leu Ile Pro  
 435 440 445  
 Gln Arg Lys Ser Arg Thr Pro Glu Asn Gln Gln Phe Pro Asp Asn Glu  
 450 455 460  
 10 Ser Glu Glu Tyr His Arg Ile Cys Glu Leu Val Ser Asp Tyr Lys Glu  
 465 470 475 480  
 Lys Gln Met Pro Lys Tyr Ser Ser Glu Asn Ser Asn Pro Glu Gln Asp  
 485 490 495  
 Leu Lys Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ser Gln Arg Leu Glu Gly Ser Glu  
 500 505 510  
 15 Asn Gly Gln Pro Glu Lys Arg Ser Gln Glu Pro Glu Ile Asn Lys Asp  
 515 520 525  
 Gly Asp Arg Glu Leu Glu Asn Phe Met Ala Ile Glu Glu Met Lys Lys  
 530 535 540  
 20 His Gly Ser Thr His Val Gly Phe Pro Glu Asn Leu Thr Asn Gly Ala  
 545 550 555 560  
 Thr Ala Gly Asn Gly Asp Asp Gly Leu Ile Pro Pro Arg Lys Ser Arg  
 565 570 575  
 Thr Pro Glu Ser Gln Gln Phe Pro Asp Thr Glu Asn Glu Glu Tyr His  
 580 585 590  
 25 Ser Asp Glu Gln Asn Asp Thr Gln Lys Gln Phe Cys Glu Glu Gln Asn  
 595 600 605  
 Thr Gly Ile Leu His Asp Glu Ile Leu Ile His Glu Glu Lys Gln Ile  
 610 615 620  
 30 Glu Val Val Glu Lys Met Asn Ser Glu Leu Ser Leu Ser Cys Lys Lys  
 625 630 635 640  
 Glu Lys Asp Ile Leu His Glu Asn Ser Thr Leu Arg Glu Glu Ile Ala  
 645 650 655  
 35 Met Leu Arg Leu Glu Leu Asp Thr Met Lys His Gln Ser Gln Leu  
 660 665 670

<210> 11

<211> 800

40 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

45 atkagcttcc gcttctgaca acactagaga tccctcccct ccctcagggt atggccctcc 60  
 acttcatttt tggtagataa catctttata ggacaggggt aaaatcccaa tactaacagg 120  
 agaatgctta ggactcctaa aggtttttga gaatgtgttg gtaagggcca ctcaatccaa 180  
 50 ttttcttgg tcctccttgt ggtctaggag gacaggcaag ggtgcagatt ttcaagaatg 240  
 catcagtaag ggccactaaa tccgaccttc ctggttcctc cttgtgtgtc gggaggaaaa 300  
 ctagtgttgc tgttgctgtg tcagttagca caactattcc gatcagcagg gtccaggggac 360  
 cactgcagg tcttgggcag ggggagaaac aaaacaaacc aaaaccatgg gcrgttttgt 420  
 ctttcagatg ggaaacactc aggcataaac aggcctcacct ttgaaatgca tcctaagcca 480  
 55 atgggacaaa tttgaccac aaaccctgga aaaagagggt gctcattttt tttgcactat 540  
 ggcttggccc caacattctc tctctgatgg ggaaaaatgg ccacctgagg gaagtacaga 600  
 ttacaatact atcctgcagc ttgacctttt ctgtaagagg gaaggcaaat ggagtgaat 660  
 accttatgtc caagctttct tttcattgaa ggagaatata ctatgcaaag cttgaaattt 720  
 60 acatcccaca ggaggacctc tcagcttacc cccatatcct agcctcccta tagctcccct 780  
 tcctattagt gataagcctc 800

<210> 12

65 <211> 102

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 281 416 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)...(102)

5 <223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 12

```

10      Met Gly Xaa Phe Val Phe Gln Met Gly Asn Thr Gln Ala Ser Thr Gly
        1          5          10          15
      Ser Pro Leu Lys Cys Ile Leu Ser Gln Trp Asp Lys Phe Asp Pro Gln
        20          25          30
      Thr Leu Glu Lys Glu Val Ala His Phe Phe Cys Thr Met Ala Trp Pro
15      35          40          45
      Gln His Ser Leu Ser Asp Gly Glu Lys Trp Pro Pro Glu Gly Ser Thr
        50          55          60
      Asp Tyr Asn Thr Ile Leu Gln Leu Asp Leu Phe Cys Lys Arg Glu Gly
        65          70          75          80
20      Lys Trp Ser Glu Ile Pro Tyr Val Gln Ala Phe Phe Ser Leu Lys Glu
        85          90          95
      Asn Thr Leu Cys Lys Ala
        100

```

25

<210> 13

<211> 1206

<212> DNA

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

35

```

ggcacgagga agttttgtgt actgaaaaag aaactgtcag aagcaaaaga aataaaatca      60
cagttagaga accaaaaagt taaatgggaa caagagctct gcagtgtgag gtttctcaca      120
ctcatgaaaa tgaaaattat ctcttacctg aaaattgcat gttgaaaaag gaaattgcca      180
tgctaaaaact ggaaatagcc acactgaaac accaatacca ggaaaaggaa aataaatact      240
ttgaggacat taagatttta aaagaaaaga atgctgaact tcagatgacc ctaaaactga      300
aagaggaatc attaactaaa agggcatctc aatatagtgg gcagcttaaa gttctgatag      360
ctgagaacac aatgctcact tctaaattga aggaaaaaca agacaaagaa atactagagg      420
cagaaattga atcacaccat cctagactgg cttctgctgt acaagacat gatcaaattg      480
tgacatcaag aaaaagtcaa gaacctgctt tccacattgc aggagatgct tgtttgcaaa      540
45      gaaaaatgaa tgttgatgtg agtagtacga tatataacaa tgaggtgctc catcaaccac      600
      tttctgaagc tcaaaggaaa tccaaaagcc taaaaattaa tctcaattat gccggagatg      660
      ctctaagaga aaatacattg gtttcagaac atgcacaaag agaccaacgt gaaacacagt      720
      gtcaaatgaa ggaagctgaa cacatgtatc aaaacgaaca agataatgtg aacaaacaca      780
      ctgaacagca ggagtctcta gatcagaaat tatttcaact acaaagcaaa aatatgtggc      840
50      ttcaacagca attagtccat gcacataaga aagctgacaa caaaagcaag ataacaattg      900
      atattcattt tcttgagagg aaaaatgcaac atcatctcct aaaagagaaa aatgaggaga      960
      tatttaatta caataacat ttaaaaaacc gtatatatca atatgaaaaa gagaaagcag      1020
      aaacagaagt tatataatag tataaactcg ccaaggagcg gattatctca tcttcattct      1080
      gtaattccag tgtttgtcac gtggttggtg aataaatgaa taaagaatga gaaaaccaga      1140
55      agctctgata cataatcata atgataatta tttcaatgca caactacggg tgggtgctgt      1200
      cgtgcc

```

60 <210> 14

<211> 317

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

# ES 2 281 416 T3

<400> 14

```

5      Met Gly Thr Arg Ala Leu Gln Cys Glu Val Ser His Thr His Glu Asn
      1          5          10          15
      Glu Asn Tyr Leu Leu His Glu Asn Cys Met Leu Lys Lys Glu Ile Ala
      20          25          30
      Met Leu Lys Leu Glu Ile Ala Thr Leu Lys His Gln Tyr Gln Glu Lys
      35          40          45
10     Glu Asn Lys Tyr Phe Glu Asp Ile Lys Ile Leu Lys Glu Lys Asn Ala
      50          55          60
      Glu Leu Gln Met Thr Leu Lys Leu Lys Glu Glu Ser Leu Thr Lys Arg
      65          70          75          80
      Ala Ser Gln Tyr Ser Gly Gln Leu Lys Val Leu Ile Ala Glu Asn Thr
      85          90          95
15     Met Leu Thr Ser Lys Leu Lys Glu Lys Gln Asp Lys Glu Ile Leu Glu
      100          105          110
      Ala Glu Ile Glu Ser His His Pro Arg Leu Ala Ser Ala Val Gln Asp
      115          120          125
20     His Asp Gln Ile Val Thr Ser Arg Lys Ser Gln Glu Pro Ala Phe His
      130          135          140
      Ile Ala Gly Asp Ala Cys Leu Gln Arg Lys Met Asn Val Asp Val Ser
      145          150          155          160
      Ser Thr Ile Tyr Asn Asn Glu Val Leu His Gln Pro Leu Ser Glu Ala
      165          170          175
25     Gln Arg Lys Ser Lys Ser Leu Lys Ile Asn Leu Asn Tyr Ala Gly Asp
      180          185          190
      Ala Leu Arg Glu Asn Thr Leu Val Ser Glu His Ala Gln Arg Asp Gln
      195          200          205
30     Arg Glu Thr Gln Cys Gln Met Lys Glu Ala Glu His Met Tyr Gln Asn
      210          215          220
      Glu Gln Asp Asn Val Asn Lys His Thr Glu Gln Gln Glu Ser Leu Asp
      225          230          235          240
      Gln Lys Leu Phe Gln Leu Gln Ser Lys Asn Met Trp Leu Gln Gln Gln
      245          250          255
35     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
40     Lys Asn Glu Glu Ile Phe Asn Tyr Asn Asn His Leu Lys Asn Arg Ile
      290          295          300
      Tyr Gln Tyr Glu Lys Glu Lys Ala Glu Thr Glu Val Ile
      305          310          315

```

45 <210> 15  
 <211> 1665  
 <212> DNA  
 50 <213> *Homo sapiens*

55

60

65

# ES 2 281 416 T3

<400> 15

```

5      gcaaactttc aagcagagcc tcccgagaag ccactctgcct tcgagcctgc cattgaaatg      60
      caaaagtctg ttccaaataa agccttggaa ttgaagaatg aacaaacatt gagagcagat      120
      cagatgttcc cttcagaatc aaaacaaaag aaggttgaag aaaattcttg ggattctgag      180
      agtctccgtg agactgtttc acagaaggat gtgtgtgtac ccaaggctac acatcaaaaa      240
      gaaatggata aaataagtgg aaaattagaa gattcaacta gcctatcaaa aatcttggat      300
10     acagttcatt cttgtgaaag agcaagggaa cttcaaaaag atcactgtga acaacgtaca      360
      ggaaaaatgg aacaaatgaa aaagaagttt tgtgtactga aaaagaaact gtcagaagca      420
      aaagaaataa aatcacagtt agagaaccaa aaagttaaat gggaaacaaga gctctgcagt      480
      gtgaggtttc tcacactcat gaaaatgaaa attatctctt acatgaaaat tgcatgttga      540
      aaaaggaaat tgccatgcta aaactggaaa tagccacact gaaacaccaa taccaggaaa      600
      aggaaaaata atactttgag gacattaaga ttttaaaaga aaagaatgct gaacttcaga      660
15     tgaccctaaa actgaaagag gaatcattaa ctaaaagggc atctcaatat agtgggcagc      720
      ttaaagtctt gatagctgag aacacaatgc tcacttctaa attgaaggaa aaacaagaca      780
      aagaaatact agaggcagaa attgaatcac accatcctag actggcttct gctgtacaag      840
      accatgatca aattgtgaca tcaagaaaaa gtcaagaacc tgctttccac attgcaggag      900
      atgcttgttt gcaaagaaaa atgaatgttg atgtgagtag tacgatatat aacaatgagg      960
20     tgctccatca accactttct gaagctcaaa ggaaatccaa aagcctaaaa ataatctca      1020
      attatgcogg agatgctcta agagaaaata cattggtttc agaacatgca caaagagacc      1080
      aacgtgaaac acagtgtcaa atgaagggaag ctgaacacat gtatcaaaac gaacaagata      1140
      atgtgaacaa acacactgaa cagcaggagt ctctagatca gaaattattt caactacaaa      1200
      gcaaaaaatat gtggcttcaa cagcaattag ttcatgcaca taagaaagct gacaacaaaa      1260
25     gcaagataac aattgatatt cattttcttg agaggaaaat gcaacatcat ctccataaag      1320
      agaaaaatga ggagatattt aattacaata accattttaa aaaccgtata tatcaatatg      1380
      aaaaagagaa agcagaaaca gaaaactcat gagagacaag cagtaagaaa cttcttttgg      1440
      agaaacaaca gaccagatct ttactcacia ctcatgctag gaggccagtc ctagcattac      1500
      cttatgttga aaatcttacc aatagtctgt gtcaacagaa tacttatitt agaagaaaaa      1560
30     ttcatgattt cttcctgaag cctggcgac agagcgagac tctgtctcaa aaaaaaaaaa      1620
      aaaaaaagaa agaaagaaat gcctgtgctt acttcgcttc ccagg      1665

```

35 <210> 16

<211> 179

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

```

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

```

# ES 2 281 416 T3

<210> 17

<211> 1681

<212> DNA

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

|    |             |            |             |            |             |             |      |
|----|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| 10 | gatacagtc   | ttcttgtg   | aaagcaagg   | aacttcaaaa | agatcactgt  | gaacaacgta  | 60   |
|    | caggaaaaat  | ggaacaaatg | aaaaagaagt  | tttgtgtact | gaaaaagaaa  | ctgtcagaag  | 120  |
|    | caaaagaaat  | aaaatcacag | ttagagaacc  | aaaaagttaa | atgggaacaa  | gagctctgca  | 180  |
|    | gtgtgagatt  | gactttaaac | caagaagaag  | agaagagaag | aaatgccgat  | atattaaatg  | 240  |
| 15 | aaaaaattag  | ggaagaatta | ggaagaatcg  | aagagcagca | taggaaagag  | ttagaagtga  | 300  |
|    | aacaacaact  | tgaacaggct | ctcagaatac  | aagatataga | attgaagagt  | gtagaaagta  | 360  |
|    | atttgaatca  | ggtttctcac | actcatgaaa  | atgaaaatta | tctcttacat  | gaaaattgca  | 420  |
|    | tggtgaaaaa  | ggaaattgcc | atgctaaaaa  | tggaatagc  | cacactgaaa  | caccaatacc  | 480  |
|    | aggaaaaagg  | aaataaaatc | tttgaggaca  | ttaagatttt | aaaagaaaaa  | aatgctgaac  | 540  |
| 20 | ttcagatgac  | cctaaaaact | aaagaggaa   | cattaactaa | aagggcacat  | caatatagtg  | 600  |
|    | ggcagcttaa  | agttctgata | gctgagaaca  | caatgctcac | ttctaaattg  | aaggaaaaac  | 660  |
|    | aagacaaaga  | aatactagag | gcagaaattg  | aatcacacca | tcctagactg  | gcttctgctg  | 720  |
|    | tacaagacca  | tgatcaaatt | gtgacatcaa  | gaaaaagtca | agaacctgct  | ttccacattg  | 780  |
|    | caggagatgc  | ttgtttgcaa | agaaaaatga  | atgttgatgt | gagtagtacg  | atatataaca  | 840  |
| 25 | atgagggtgct | ccatcaacca | ctttctgaag  | ctcaaggaa  | atccaaaagc  | ctaaaaatta  | 900  |
|    | atctcaatta  | tgccggagat | gctctaagag  | aaaatacatt | ggtttcagaa  | catgcacaaa  | 960  |
|    | gagaccaacy  | tgaacacag  | tgtcaaatga  | aggaagctga | acacatgtat  | caaacgaac   | 1020 |
|    | aagataatgt  | gaacaaacac | actgaacagc  | aggagtctct | agatcagaaa  | ttatttcaac  | 1080 |
|    | tacaaagcaa  | aaatatgtgg | cttcaacagc  | aattagttca | tgacacataag | aaagctgaca  | 1140 |
| 30 | acaaaagcaa  | gataacaatt | gatattcatt  | ttcttgagag | gaaaatgcaa  | catcatctcc  | 1200 |
|    | taaaagagaa  | aaatgaggag | atattttaatt | acaataacca | tttaaaaaac  | cgtatatatc  | 1260 |
|    | aatatgaaaa  | agagaaaagc | gaaacagaaa  | actcatgaga | gacaagcagt  | aagaaaacttc | 1320 |
|    | ttttggagaa  | acaacagacc | agatctttac  | tcacaactca | tgctaggagg  | ccagtccatg  | 1380 |
|    | cattacctta  | tggtgaaaaa | tcttaccaat  | agtctgtgtc | aacagaatac  | ttattttaga  | 1440 |
| 35 | agaaaaattc  | atgatttctt | cctgaagcct  | acagacataa | aataacagtg  | tgaagaatta  | 1500 |
|    | cttgttcacg  | aattgcataa | aagctgcca   | ggatttccat | ctacctgga   | tgatgccgga  | 1560 |
|    | gacatcattc  | aatccaacca | gaatctcgct  | ctgtcactca | ggctggagtg  | cagtgggcgc  | 1620 |
|    | aatctcggtc  | cactgcaact | ctgcctccca  | ggttcacgcc | attctctggc  | acagcctccc  | 1680 |
|    | g           |            |             |            |             |             | 1681 |

<210> 18

<211> 432

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65



# ES 2 281 416 T3

<400> 18

|    |       |     |     |     |         |     |     |     |         |        |     |     |     |     |        |     |
|----|-------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|---------|--------|-----|-----|-----|-----|--------|-----|
| 5  | Asp 1 | Thr | Val | His | Ser 5   | Cys | Glu | Arg | Ala     | Arg 10 | Glu | Leu | Gln | Lys | Asp 15 | His |
|    | Cys   | Glu | Gln | Arg | Thr 20  | Gly | Lys | Met | Glu 25  | Gln    | Met | Lys | Lys | Lys | Phe 30 | Cys |
|    | Val   | Leu | Lys | Lys | Lys 35  | Leu | Ser | Glu | Ala 40  | Lys    | Glu | Ile | Lys | Ser | Gln 45 | Leu |
| 10 | Glu   | Asn | Gln | Lys | Val 50  | Lys | Trp | Glu | Gln 55  | Glu    | Leu | Cys | Ser | Val | Arg    | Leu |
|    | Thr   | Leu | Asn | Gln | Glu 65  | Glu | Lys | Arg | Arg 70  | Asn    | Ala | Asp | Ile | Leu | Asn 80 |     |
|    | Glu   | Lys | Ile | Arg | Glu 85  | Glu | Leu | Gly | Arg 90  | Ile    | Glu | Gln | His | Arg | Lys 95 |     |
| 15 | Glu   | Leu | Glu | Val | Lys 100 | Gln | Gln | Leu | Glu 105 | Gln    | Ala | Leu | Arg | Ile | Gln    | Asp |
|    | Ile   | Glu | Leu | Lys | Ser 115 | Val | Glu | Ser | Asn 120 | Leu    | Asn | Gln | Val | Ser | His    | Thr |
| 20 | His   | Glu | Asn | Glu | Asn 130 | Tyr | Leu | Leu | His 135 | Glu    | Asn | Cys | Met | Leu | Lys    | Lys |
|    | Glu   | Ile | Ala | Met | Leu 145 | Lys | Leu | Glu | Ile 150 | Ala    | Thr | Leu | Lys | His | Gln    | Tyr |
|    | Gln   | Glu | Lys | Glu | Asn 165 | Lys | Tyr | Phe | Glu 170 | Asp    | Ile | Lys | Ile | Leu | Lys    | Glu |
| 25 | Lys   | Asn | Ala | Glu | Leu 180 | Gln | Met | Thr | Leu 185 | Lys    | Leu | Lys | Glu | Glu | Ser    | Leu |
|    | Thr   | Lys | Arg | Ala | Ser 195 | Gln | Tyr | Ser | Gly 200 | Gln    | Leu | Lys | Val | Leu | Ile    | Ala |
| 30 | Glu   | Asn | Thr | Met | Leu 210 | Thr | Ser | Lys | Leu 215 | Lys    | Glu | Lys | Gln | Asp | Lys    | Glu |
|    | Ile   | Leu | Glu | Ala | Glu 225 | Ile | Glu | Ser | His 230 | His    | Pro | Arg | Leu | Ala | Ser    | Ala |
|    | Val   | Gln | Asp | His | Asp 245 | Gln | Ile | Val | Thr 250 | Ser    | Arg | Lys | Ser | Gln | Glu    | Pro |
| 35 | Ala   | Phe | His | Ile | Ala 260 | Gly | Asp | Ala | Cys 265 | Leu    | Gln | Arg | Lys | Met | Asn    | Val |
|    | Asp   | Val | Ser | Thr | Ile 275 | Tyr | Asn | Asn | Glu 280 | Val    | Leu | His | Gln | Pro | Leu    |     |
| 40 | Ser   | Glu | Ala | Gln | Arg 290 | Lys | Ser | Lys | Ser 295 | Leu    | Lys | Ile | Asn | Leu | Asn    | Tyr |
|    | Ala   | Gly | Asp | Ala | Leu 305 | Arg | Glu | Asn | Thr 310 | Leu    | Val | Ser | Glu | His | Ala    | Gln |
|    | Arg   | Asp | Gln | Arg | Glu 325 | Thr | Gln | Cys | Gln 330 | Met    | Lys | Glu | Ala | Glu | His    | Met |
| 45 | Tyr   | Gln | Asn | Glu | Gln 340 | Asp | Asn | Val | Asn 345 | Lys    | His | Thr | Glu | Gln | Gln    | Glu |
|    | Ser   | Leu | Asp | Gln | Lys 355 | Leu | Phe | Gln | Leu 360 | Gln    | Ser | Lys | Asn | Met | Trp    | Leu |
| 50 | Gln   | Gln | Gln | Leu | Val 370 | His | Ala | His | Lys 375 | Lys    | Ala | Asp | Asn | Lys | Ser    | Lys |
|    | Ile   | Thr | Ile | Asp | Ile 385 | His | Phe | Leu | Glu 390 | Arg    | Lys | Met | Gln | His | His    | Leu |
|    | Leu   | Lys | Glu | Lys | Asn 405 | Glu | Glu | Ile | Phe 410 | Asn    | Tyr | Asn | Asn | His | Leu    | Lys |
| 55 | Asn   | Arg | Ile | Tyr | Gln 420 | Tyr | Glu | Lys | Glu 425 | Lys    | Ala | Glu | Thr | Glu | Asn    | Ser |

<210> 19

<211> 3681

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 281 416 T3

<400> 19

|    |             |             |             |             |             |             |      |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
|    | tccgagctga  | ttacagacac  | caaggaagat  | gctgtaaaga  | gtcagcagcc  | acagccctgg  | 60   |
|    | ctagctggcc  | ctgtgggcat  | ttattagtaa  | agttttaatg  | acaaaagctt  | tgagtcaaca  | 120  |
| 5  | cacccgtggg  | taattaacct  | ggatcatccc  | accctggaga  | gccatcctgc  | ccatgggtga  | 180  |
|    | tcaaagaagg  | aacatctgca  | ggaaacacctg | atgaggctgc  | acccttggcg  | gaaagaacac  | 240  |
|    | ctgacacagc  | tgaagcttg   | gtggaaaaaa  | cacctgatga  | ggctgcaccc  | ttggtggaaa  | 300  |
|    | gaacacctga  | cacggctgaa  | agcttgggtg  | aaaaaacacc  | tgatgaggct  | gcacaccttg  | 360  |
|    | tggagggaac  | atctgacaaa  | attcaatggt  | tggagaaagc  | gacatctgga  | aagttcgaac  | 420  |
| 10 | agtcagcaga  | agaaacacct  | agggaaatta  | cgagtcctgc  | aaaagaaaca  | tctgagaaat  | 480  |
|    | ttacgtggcc  | agcaaaagga  | agacctagga  | agatcgcatg  | ggagaaaaaa  | gaagacacac  | 540  |
|    | ctagggaaat  | tatgagtcct  | gcaaaagaaa  | catctgagaa  | atttacgtgg  | gcagcaaaag  | 600  |
|    | gaagacctag  | gaagatcgca  | tgggagaaaa  | aagaaacacc  | tgtaaagact  | ggatgcgtgg  | 660  |
|    | caagagtaac  | atctaataaa  | actaaagtgt  | tggaaaaagg  | aagatctaag  | atgattgcat  | 720  |
| 15 | gtcctacaaa  | agaatcatct  | acaaaagcaa  | gtgccaatga  | tcagagggttc | ccatcagaat  | 780  |
|    | ccaaacaaga  | ggaagatgaa  | gaatattctt  | gtgattctcg  | gagttctctt  | gagagttctg  | 840  |
|    | caaagattca  | agtgtgtata  | cctgagttct  | tatatcaaaa  | agtaatggag  | ataaatagag  | 900  |
|    | aagttagaag  | gcctcctaag  | aagccatctg  | ccttcaagcc  | tgccattgaa  | atgcataaact | 960  |
| 20 | ctgttccaaa  | taaagccttt  | gaattgaaga  | atgaacaaac  | attgagagca  | gatccgatgt  | 1020 |
|    | tcccaccaga  | atccaaacaa  | aaggactatg  | aagaaaattc  | ttgggattct  | gagagttctt  | 1080 |
|    | gtgagactgt  | ttcacagaag  | gatgtgtgtt  | tacccaaggc  | tacacatcaa  | aaagaaatag  | 1140 |
|    | ataaaataaa  | tgggaaatta  | gaagagttct  | ctaataaaga  | tggtcttctg  | aaggctacct  | 1200 |
|    | gcggaatgaa  | agttttctatt | ccaactaaag  | ccttagaatt  | gaaggacatg  | caaactttca  | 1260 |
|    | aagcagagcc  | tccgggggaag | ccatctgcct  | tcgagcctgc  | caactgaaatg | caaaagtctt  | 1320 |
| 25 | tcccaataaa  | agccttgga   | ttgaaaaaatg | aacaaaacatt | gagagcagat  | gagatactcc  | 1380 |
|    | catcagaatc  | caaacaaaag  | gactatgaag  | aaagttcttg  | ggattctgag  | agtctctgtg  | 1440 |
|    | agactgtttc  | acagaaggat  | gtgtgtttac  | ccaaggctrc  | rcatcaaaaa  | gaaatagata  | 1500 |
|    | aaataaatgg  | aaaattagaa  | gggtctcctg  | ttaaagatgg  | tcttctgaag  | gctaactgcy  | 1560 |
|    | gaatgaaagt  | ttctattcca  | actaaagcct  | tagaattgat  | ggacatgcaa  | actttcfaag  | 1620 |
| 30 | cagagcctcc  | cgagaagcca  | tctgccttcg  | agcctgccat  | tgaaatgcaa  | aagtctgttc  | 1680 |
|    | caaataaagc  | ccttggaattg | aagaatgaac  | aaacattgag  | agcagatgag  | atactcccat  | 1740 |
|    | cagaattcaa  | acaaaaggac  | tatgaagaaa  | gttcttgagg  | ttctgtgagt  | ctctgtgaga  | 1800 |
|    | ctgtttcaca  | gaaggatgtg  | tggtttacca  | aggctrcrca  | tcaaaaagaa  | atagataaaa  | 1860 |
|    | taaatggaaa  | attagaagag  | tctcctgata  | atgatgggtt  | tctgaaggct  | ccctgcagaa  | 1920 |
| 35 | tgaaagtttc  | tattccaact  | aaagccttag  | aattgatgga  | catgcaaaact | ttcaaagcag  | 1980 |
|    | agcctcccga  | gaagccatct  | gccttcgagc  | ctgccattga  | aatgcaaaaag | tctgttccaa  | 2040 |
|    | ataaagcctt  | ggaattgaag  | aatgaacaaa  | cattgagagc  | agatcagatg  | ttcccttcag  | 2100 |
|    | aatcaaaaca  | aaagaasgtt  | gaagaaaatt  | cttgggattc  | tgagagtctc  | cgtgagactg  | 2160 |
|    | tttcacagaa  | ggatgtgtgt  | gtacccaagg  | ctacacatca  | aaaagaaatg  | gataaaaata  | 2220 |
| 40 | gtgaaaaatt  | agaagattca  | actagcctat  | caaaaatctt  | ggatacagtt  | cattcttctg  | 2280 |
|    | aaagagcaag  | ggaacttcaa  | aaagatcact  | gtgaacaacg  | tacaggaaaa  | atggaacaaa  | 2340 |
|    | tgaaaaagaa  | gttttgtgtg  | ctgaaaaaga  | aactgtcaga  | agcaaaagaa  | ataaaatcac  | 2400 |
|    | agtttagagaa | ccaaaaagtt  | aaatgggaac  | aagagctctg  | cagtgtgagg  | tttctcacac  | 2460 |
|    | tcatgaaaat  | gaaaattatc  | tcttacatga  | aaattgcatg  | ttgaaaaagg  | aaattgccat  | 2520 |
| 45 | gctaaaaactg | gaaatagcca  | cactgaaaca  | ccaataccag  | gaaaaaggaaa | ataaatactt  | 2580 |
|    | tgaggacatt  | aagattttta  | aagaaaagaa  | tgctgaactt  | cagatgaccc  | taaaactgaa  | 2640 |
|    | agaggaatca  | ttaactaaaa  | gggcatctca  | atatagtggg  | cagcttaag   | ttctgatagc  | 2700 |
|    | tgagaacaca  | atgctcactt  | ctaaattgaa  | ggaaaaacaa  | gacaaagaaa  | tactagaggc  | 2760 |
|    | agaaattgaa  | tcacaccatc  | ctagactggc  | ttctgtgtga  | caagaccatg  | atcaaatgtt  | 2820 |
| 50 | gacatcaaga  | aaaagtcaag  | aacctgcttt  | ccacattgca  | ggagatgctt  | gtttgcaaa   | 2880 |
|    | aaaaatgaat  | gttgatgtga  | gtagtacgat  | acataacaat  | gaggtgctcc  | atcaaccact  | 2940 |
|    | ttctgaagct  | caaaggaaat  | ccaaaagcct  | aaaaattaat  | ctcaattatg  | cmggagatgc  | 3000 |
|    | tctaagagaa  | aatacattgg  | tttcagaaca  | tgacacaaaga | gaccaacgtg  | aaacacagtg  | 3060 |
|    | tcaaatgaag  | gaagctgaac  | acatgtatca  | aaacgaacaa  | gataatgtga  | acaaacacac  | 3120 |
| 55 | tgaacagcag  | gagtctctag  | atcagaaatt  | atttcaacta  | caaagcaaaa  | atatgtggct  | 3180 |
|    | tcaacagcaa  | ttagtctcatg | cacataagaa  | agctgacaa   | aaaagcaaga  | taacaattga  | 3240 |
|    | tattcatttt  | cttgagagga  | aaatgcaaca  | tcatctccta  | aaagagaaaa  | atgaggagat  | 3300 |
|    | atttaattac  | aataaccatt  | taaaaaacccg | tatatatcaa  | tatgaaaaag  | agaaaagcaga | 3360 |
|    | aacagaaaac  | tcatgagaga  | caagcagtaa  | gaaacttctt  | ttggagaaac  | aacagaccag  | 3420 |
| 60 | atctttactc  | acaactcatg  | ctaggaggcc  | agtcctagca  | tcaccttatg  | ttgaaaatct  | 3480 |
|    | taccaatagt  | ctgtgtcaac  | agaatactta  | ttttagaaga  | aaaattcatg  | atttcttcc   | 3540 |
|    | gaagcctaca  | gacataaaat  | aacagtgtga  | agaattactt  | gttcacgaat  | tgcataaaagc | 3600 |
|    | tgacaggat   | tccatctac   | cctgatgatg  | cagcagacat  | cattcaatcc  | aaccagaatc  | 3660 |
|    | tgcctctgtc  | actcaggctg  | g           |             |             |             | 3681 |

<210> 20

<211> 1424

# ES 2 281 416 T3

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 20

```

tccgagctga ttacagacac caaggaagat gctgtaaaga gtcagcagcc acagccctgg 60
ctagctggcc ctgtgggcat ttattagtaa agttttaatg acaaaagctt tgagtcaaca 120
caccctggg taattaacct ggtcatcccc accctggaga gccatcctgc ccatgggtga 180
10 tcaaagaagg aacatctgca ggaacacctg atgaggctgc acccttggcg gaaagaacac 240
ctgacacagc tgaaagcttg gtggaaaaaa cacctgatga ggctgcaccc ttgggtggaa 300
gaacacctga cacggctgaa agcttgggtg aaaaaacacc tgatgaggct gcatccttgg 360
tggagggaac atctgacaaa attcaatgtt tggagaaagc gacatctgga aagttcgaac 420
agtcagcaga agaaacacct agggaaatta cgagtcctgc aaaagaaaca tctgagaaat 480
15 ttacgtggcc agcaaaagga agacctagga agatcgcatg ggagaaaaaa gaagacacac 540
ctagggaaat tatgagtcct gcaaaagaaa catctgagaa atttacgtgg gcagcaaaag 600
gaagacctag gaagatcgca tgggagaaaa aagaaacacc tgtaaagact ggatgcgtgg 660
caagagtaac atctaataaa actaaagttt tggaaaaagg aagatctaag atgattgcat 720
gtcctacaaa agaatacatc acaaaagcaa gtgccaatga tcagagggttc ccatacagaat 780
20 ccaaacaaga ggaagatgaa gaatattctt gtgattctcg gagtctcttt gagagtcttg 840
caaagattca agtgtgtata cctgagtcct tatatcaaaa agtaatggag ataaatagag 900
aagtagaaga gcctoctaag aagccatctg ccttcaagcc tgccattgaa atgcaaaact 960
ctgttccaaa taaagccttt gaattgaaga atgaacaaac attgagagca gatccgatgt 1020
tcccaccaga atccaaacaa aaggactatg aagaaaattc ttgggattct gagagtctct 1080
25 gtgagactgt ttacacagaag gatgtgtgtt tacccaaggc tacacatcaa aaagaaatag 1140
ataaaataaa tggaaaatta gaaggtaaga accgtttttt atttaaaaat cagttgaccg 1200
aatattttct taaactgatg aggagggata tcctctagta gctgaagaaa attacctcct 1260
aatgcaaac catgtgaaaa aagagaagtg caatggctcg aagttgtatg tctcatcagg 1320
tgttggcaac agactatatt gagagtgtcg aaaaggagct gaattattag tttgaattca 1380
30 agatattgca agacctgaga gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1424

```

<210> 21

<211> 674

35 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

```

attccgagct gattacagac accaaggaag atgctgtaaa gagtcagcag ccacagccct 60
ggctagctgg ccctgtgggc atttattagt aaagttttaa tgacaaaagc tttgagtcaa 120
cacaccctg ggtaattaac ctggtcatcc ccaccctgga gagccatcct gccatgggt 180
gatcaaaaga ggaacatctg caggaacacc tgatgaggct gcacccttgg cggaaagaac 240
45 acctgacaca gctgaaagct tgggtgaaaa aacacctgat gaggctgcac ccttgggtga 300
aagaacacct gacacggctg aaagcttggg ggaaaaaaca cctgatgagg ctgcatcctt 360
ggtggaggga acatctgaca aaattcaatg tttggagaaa gcgacatctg gaaagttcga 420
acagtcagca gaagaaacac ctagggaatg tacgagtcct gcaaaagaaa catctgagaa 480
atttacgtgg ccagcaaaag gaagacctag gaagatcgca tgggagaaaa aagatgactc 540
agttaaggca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600
50 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
aaaaaaaaaa aaaa 674

```

<210> 22

<211> 1729

55 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

60 <221> incierto

<222> (11)

<223> n = A, T, C o G

65 <221> incierto

<222> (1128)

<223> n = A, T, C o G

# ES 2 281 416 T3

<400> 22

```

gaaagttcga ncagtcagca gaagaaacac ctagggaat tacgagtcct gcaaaagaaa 60
catctgagaa atttacgtgg ccagcaaaag gaagatcgca tgggagaaaa 120
aagaagacac acctagggaa attatgagtc ccgcaaaaaga aacatctgag aaatttacgt 180
5 gggcagcaaaa aggaagacct aggaagatcg catgggagaa aaaagaaaca cctgtaaaga 240
ctggatgctg ggcaagagta acatctaata aaactaaagt tttggaaaaa ggaagatcta 300
agatgattgc atgtcctaca aaagaatcat ctacaaaagc aagtgccaat gatcagaggt 360
tcccatcaga atccaaacaa gaggaagatg aagaatatct tttgtattct cggagtctct 420
10 ttgagagttc tgcaaagatt caagtgtgta tacctgagtc tatatatcaa aaagtaattg 480
agataaataag agaagtagaa gagcctccta agaagccatc tgccttcaag cctgccattg 540
aaatgcaaaa ctctgttcca aataaagcct ttgaattgaa gaatgaacaa acattgagag 600
cagatccgat gttccacca gaatccaaac aaaaggacta tgaagaaaat tcttgggatt 660
ctgagagttc ctgtgagact gtttcacaga aggatgtgtg tttacccaag gctacacatc 720
15 aaaaagaaat agataaaata aatggaaaat tagaagagtc tcctaataaa gatggtcttc 780
tgaaggctac ctgcggaatg aaagtttcta ttccaactaa agccttagaa ttgaaggaca 840
tgcaaaacttt caaagcagag cctccgggga agccatctgc cttcgagcct gccactgaaa 900
tgcaaaagtc tgtcccaaat aaagccttgg aattgaaaaa tgaacaaaca ttgagagcag 960
atgagatact cccatcagaa tccaaacaaa aggactatga agaaaattct tgggatactg 1020
20 agagtctctg tgagactgtt tcacagaagg atgtgtgtt acccaaggct gcgcatcaaa 1080
aagaaataga taaaataaat ggaaaattag aagggtctcc tggtaaanat ggtcttctga 1140
aggctaactg cggaatgaaa gtttctattc caactaaagc cttagaattg atggacatgc 1200
aaactttcaa agcagagcct cccgagaagc catctgcctt cgagcctgcc attgaaatgc 1260
aaaagtctgt tccaaataaa gccttggaaat tgaagaatga acaaacattg agagcagatg 1320
25 agatactccc atcagaatcc aaacaaaagg actatgaaga aagtctcttg gattctgaga 1380
gtctctgtga gactgtttca cagaaggatg tgtgtttacc caaggctgcg catcaaaaag 1440
aaatagataa aataaatgga aaattagaag gtaagaaccg ttttttattt aaaaatcatt 1500
tgaccaataa tttctctaaa ttgatgagga aggatatcct ctagttagctg aagaaaatta 1560
cctcctaaat gcaaacatg gaaaaaaaaga gaagtgcatt ggtcataagc tatgtgtctc 1620
30 atcaggcatt ggcaacagac tatattgtga gtgtggaaga ggagctgaat tactagttta 1680
aattcaagat attccaagac gtgaggaaaa tgagaaaaaa aaaaaaaaaa 1720

```

<210> 23

35 <211> 1337

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 23

```

aaaaagaaat agataaaata aatggaaaat tagaagggtc tcctgttaaa gatggtcttc 60
tgaaggctaa ctgcggaatg aaagtttcta ttccaactaa agccttagaa ttgatggaca 120
tgcaaaacttt caaagcagag cctcccgaga agccatctgc cttcgagcct gccattgaaa 180
45 tgcaaaagtc tgttccaaat aaagccttgg aattgaagaa tgaacaaaca ttgagagcag 240
atgagatact cccatcagaa tccaaacaaa aggactatga agaaagttct tgggattctg 300
agagtctctg tgagactgtt tcacagaagg atgtgtgtt acccaaggct gcgcatcaaa 360
aagaaataga taaaataaat ggaaaattag aagagtctcc tgataatgat ggttttctga 420
aggctccctg cagaatgaaa gtttctattc caactaaagc cttagaattg atggacatgc 480
50 aaactttcaa agcagagcct cccgagaagc catctgcctt cgagcctgcc attgaaatgc 540
aaaagtctgt tccaaataaa gccttggaaat tgaagaatga acaaacattg agagcagatc 600
agatgttccc ttcagaatca aaacaaaaga aggttgaaga aaattcttgg gattctgaga 660
gtctccgtga gactgtttca cagaaggatg tgtgtgtacc caaggctaca catcaaaaag 720
aaatggataa aataagtgga aaattagaag attcaactag cctatcaaaa atcttggata 780
55 cagttcatct tttgtgaaaga gcaagggaac ttcaaaaaga tcaactgtga caacgtacag 840
gaaaaatgga acaaatgaaa aagaagtttt gtgtactgaa aaagaaactg tcagaagcaa 900
aagaaataaa atcacagtta gaaaccaaaa agtttaaatg ggaaccaagag ctctgcagtg 960
tgagattgac tttaaaccaa gaagaagaga agagaagaaa tgccgatata ttaaatgaaa 1020
aaattaggga agaattagga agaatcgaag agcagcatag gaaagagtta gaagtgaac 1080
60 aacaacttga acaggctctc agaatacaag atatagaatt gaagagtgtg gaaagtaatt 1140
tgaatcaggt ttctcacact catgaaaatg aaaaattatct cttacatgaa aattgcatgt 1200
tgaaaaagga aattgccatg ctaaaactgg aaatagccac actgaaacac caataccagg 1260
aaaaggaaaa taaatacttt gaggacatta agattttaaa agaaaagaat gctgaacttc 1320
agatgacccc tcgtgcc
1337

```

65 <210> 24

<211> 2307

# ES 2 281 416 T3

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 24

```

attgagagca gatgagatac tcccatcaga atccaaacaa aaggactatg aagaaagtgc 60
ttgggattct gagagtctct gtgagactgt ttcacagaag gatgtgtgtt tacccaaggc 120
tacacatcaa aaagaaatag ataaaataaa tggaataa gaaggggtctc ctgttaaaga 180
10 tggctcttctg aaggctaact gcggaatgaa agtttctatt ccaactaaag ccttagaatt 240
gatggacatg caaactttca aagcagagcc tcccagagaag ccatctgcct tcgagcctgc 300
cattgaaatg caaaagtctg ttccaaataa agccttgga ttgaagaatg aacaaacatt 360
gagagcagat gagatactcc catcagaatc caaacaaaag gactatgaag aaagtctctg 420
ggattcttgag agtctctgtg agactgtttc acagaaggat gtgtgtttac ccaaggctac 480
15 acatcaaaaa gaaatagata aaataaatgg aaaattagaa gagtctcctg ataatgatgg 540
ttttctgaag tctccctgca gaatgaaagt ttctattcca actaaagcct tagaattgat 600
ggacatgcaa actttcaaa gagagcctcc cgagaagcca tctgccttcg agcctgccat 660
tgaaatgcaa aagtctgttc caaataaagc cttggaattg aagaatgaac aaacattgag 720
agcagatcag atgttccctt cagaatcaaa acaaaagaac gttgaagaaa attccttgga 780
20 tctgagagt ctccgtgaga ctgtttcaca gaaggtgtg tgtgtacca aggttacaca 840
tcaaaaagaa atggataaaa taagtggaaa attagaagat tcaactagcc tatcaaaaat 900
cttgatatac gttcattctt gtgaaagagc aagggaactt caaaaagatc actgtgaaca 960
acgtacagga aaaatggaac aaatgaaaaa gaagttttgt gtactgaaaa agaaactgtc 1020
agaagcaaaa gaaataaaat cacagttaga gaaccaaaaa gttaaatggg aacaagagct 1080
25 ctgcagtgtg aggtttctca cactcatgaa aatgaaaatt atctcttaca tgaaaattgc 1140
atgttgaaaa aggaaattgc catgctaaaa ctggaaatag ccacactgaa acaccaatac 1200
caggaaaagg aaaaataaata ctttgaggac attaagattt taaaagaaaa gaatgctgaa 1260
cttcagatga ccctaaaact gaaagaggaa tcatlaacta aaagggcac tcaatatagt 1320
gggcagctta aagttctgat agctgagaac acaatgctca cttctaaatt gaaggaaaaa 1380
30 caagacaaag aaatactaga ggcagaaatt gaatcacacc atcctagact ggcttctgct 1440
gtacaagacc atgatcaaat tgtgacatca agaaaaagtc aagaacctgc tttccacatt 1500
gcaggagatg cttgtttgca aagaaaaatg aatgttgatg tgagtagtac gatataatac 1560
aatgagggtc tccatcaacc actttctgaa gctcaaagga aatccaaaag ctaaaaatt 1620
aatctcaatt atgcaggaga tgctctaaga gaaaatacat tggtttcaga acatgcacaa 1680
35 agagaccaac gtgaaacaca gtgtcaaatg aaggaagctg aacacatgta tcaaaacgaa 1740
caagataatg tgaacaaaca cactgaacag caggagtctc tagatcagaa attatttcaa 1800
ctacaaagca aaaatatgtg gcttcaacag caattagttc atgcacataa gaaagctgac 1860
aacaaaagca agataacaat tgatattcat tttcttgaga ggaaaatgca acatcatctc 1920
ctaaaagaga aaaatgagga gatatttaac tacaataacc atttaaaaaa ccgtatata 1980
40 caatatgaaa aagagaaagc agaaacagaa aactcatgag agacaagcag taagaaactt 2040
cttttgagga aacaacagac cagatcttta ctcacaactc atgctaggag gccagtccta 2100
gcacacactt atgttgaaaa tcttaccaat agtctgtgtc aacagaatac ttattttaga 2160
agaaaaattc atgatttctt cctgaagcct acagacataa aataacagtg tgaagaatta 2220
cttggttcacg aattgcataa agctgcacag gattcccatc taccctgatg atgcagcaga 2280
45 catcattcaa tccaaccaga atctcgc 2307

```

<210> 25

<211> 650

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<220>

55 <221> incierto

<222> (310)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<221> incierto

60 <222> (429)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<221> incierto

65 <222> (522)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

# ES 2 281 416 T3

<400> 25

|    |                                                                 |                 |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----------------|
| 5  | Met Ser Pro Ala Lys Glu Thr Ser Glu Lys Phe Thr Trp Ala Ala Lys | 5 10 15         |
|    | Gly Arg Pro Arg Lys Ile Ala Trp Glu Lys Lys Glu Thr Pro Val Lys | 20 25 30        |
| 10 | Thr Gly Cys Val Ala Arg Val Thr Ser Asn Lys Thr Lys Val Leu Glu | 35 40 45        |
|    | Lys Gly Arg Ser Lys Met Ile Ala Cys Pro Thr Lys Glu Ser Ser Thr | 50 55 60        |
| 15 | Lys Ala Ser Ala Asn Asp Gln Arg Phe Pro Ser Glu Ser Lys Gln Glu | 65 70 75 80     |
|    | Glu Asp Glu Glu Tyr Ser Cys Asp Ser Arg Ser Leu Phe Glu Ser Ser | 85 90 95        |
| 20 | Ala Lys Ile Gln Val Cys Ile Pro Glu Ser Ile Tyr Gln Lys Val Met | 100 105 110     |
|    | Glu Ile Asn Arg Glu Val Glu Glu Pro Pro Lys Lys Pro Ser Ala Phe | 115 120 125     |
| 25 | Lys Pro Ala Ile Glu Met Gln Asn Ser Val Pro Asn Lys Ala Phe Glu | 130 135 140     |
|    | Leu Lys Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp Pro Met Phe Pro Pro Glu | 145 150 155 160 |
|    | Ser Lys Gln Lys Asp Tyr Glu Glu Asn Ser Trp Asp Ser Glu Ser Leu | 165 170 175     |
| 35 | Cys Glu Thr Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Leu Pro Lys Ala Thr His | 180 185 190     |
|    | Gln Lys Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Glu Ser Pro Asn | 195 200 205     |
|    | Lys Asp Gly Leu Leu Lys Ala Thr Cys Gly Met Lys Val Ser Ile Pro | 210 215 220     |
| 45 | Thr Lys Ala Leu Glu Leu Lys Asp Met Gln Thr Phe Lys Ala Glu Pro | 225 230 235 240 |
|    | Pro Gly Lys Pro Ser Ala Phe Glu Pro Ala Thr Glu Met Gln Lys Ser | 245 250 255     |
| 50 | Val Pro Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala | 260 265 270     |
|    | Asp Glu Ile Leu Pro Ser Glu Ser Lys Gln Lys Asp Tyr Glu Glu Ser | 275 280 285     |
| 55 | Ser Trp Asp Ser Glu Ser Leu Cys Glu Thr Val Ser Gln Lys Asp Val | 290 295 300     |
| 60 | Cys Leu Pro Lys Ala Xaa His Gln Lys Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly | 305 310 315 320 |
|    | Lys Leu Glu Gly Ser Pro Val Lys Asp Gly Leu Leu Lys Ala Asn Cys | 325 330 335     |
| 65 |                                                                 |                 |

# ES 2 281 416 T3

|    |                                                                 |             |
|----|-----------------------------------------------------------------|-------------|
|    | Gly Met Lys Val Ser Ile Pro Thr Lys Ala Leu Glu Leu Met Asp Met |             |
|    | 340                                                             | 345 350     |
| 5  | Gln Thr Phe Lys Ala Glu Pro Pro Glu Lys Pro Ser Ala Phe Glu Pro |             |
|    | 355                                                             | 360 365     |
|    | Ala Ile Glu Met Gln Lys Ser Val Pro Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys |             |
|    | 370                                                             | 375 380     |
| 10 | Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp Glu Ile Leu Pro Ser Glu Ser Lys |             |
|    | 385                                                             | 390 395 400 |
|    | Gln Lys Asp Tyr Glu Glu Ser Ser Trp Asp Ser Glu Ser Leu Cys Glu |             |
| 15 | 405                                                             | 410 415     |
|    | Thr Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Leu Pro Lys Ala Xaa His Gln Lys |             |
|    | 420                                                             | 425 430     |
| 20 | Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Glu Ser Pro Asp Asn Asp |             |
|    | 435                                                             | 440 445     |
|    | Gly Phe Leu Lys Ala Pro Cys Arg Met Lys Val Ser Ile Pro Thr Lys |             |
|    | 450                                                             | 455 460     |
| 25 | Ala Leu Glu Leu Met Asp Met Gln Thr Phe Lys Ala Glu Pro Pro Glu |             |
|    | 465                                                             | 470 475 480 |
|    | Lys Pro Ser Ala Phe Glu Pro Ala Ile Glu Met Gln Lys Ser Val Pro |             |
| 30 | 485                                                             | 490 495     |
|    | Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp Gln |             |
|    | 500                                                             | 505 510     |
| 35 | Met Phe Pro Ser Glu Ser Lys Gln Lys Xaa Val Glu Glu Asn Ser Trp |             |
|    | 515                                                             | 520 525     |
|    | Asp Ser Glu Ser Leu Arg Glu Thr Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Val |             |
|    | 530                                                             | 535 540     |
| 40 | Pro Lys Ala Thr His Gln Lys Glu Met Asp Lys Ile Ser Gly Lys Leu |             |
|    | 545                                                             | 550 555 560 |
|    | Glu Asp Ser Thr Ser Leu Ser Lys Ile Leu Asp Thr Val His Ser Cys |             |
| 45 | 565                                                             | 570 575     |
|    | Glu Arg Ala Arg Glu Leu Gln Lys Asp His Cys Glu Gln Arg Thr Gly |             |
|    | 580                                                             | 585 590     |
| 50 | Lys Met Glu Gln Met Lys Lys Lys Phe Cys Val Leu Lys Lys Lys Leu |             |
|    | 595                                                             | 600 605     |
|    | Ser Glu Ala Lys Glu Ile Lys Ser Gln Leu Glu Asn Gln Lys Val Lys |             |
|    | 610                                                             | 615 620     |
| 55 | Trp Glu Gln Glu Leu Cys Ser Val Arg Phe Leu Thr Leu Met Lys Met |             |
|    | 625                                                             | 630 635 640 |
| 60 | Lys Ile Ile Ser Tyr Met Lys Ile Ala Cys                         |             |
|    | 645                                                             | 650         |

<210> 26

<211> 228

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 281 416 T3

<400> 26

```

5      Met Ser Pro Ala Lys Glu Thr Ser Glu Lys Phe Thr Trp Ala Ala Lys
           5              10              15

      Gly Arg Pro Arg Lys Ile Ala Trp Glu Lys Lys Glu Thr Pro Val Lys
           20              25              30

10     Thr Gly Cys Val Ala Arg Val Thr Ser Asn Lys Thr Lys Val Leu Glu
           35              40              45

      Lys Gly Arg Ser Lys Met Ile Ala Cys Pro Thr Lys Glu Ser Ser Thr
           50              55              60

15     Lys Ala Ser Ala Asn Asp Gln Arg Phe Pro Ser Glu Ser Lys Gln Glu
           65              70              75              80

      Glu Asp Glu Glu Tyr Ser Cys Asp Ser Arg Ser Leu Phe Glu Ser Ser
           85              90              95

      Ala Lys Ile Gln Val Cys Ile Pro Glu Ser Ile Tyr Gln Lys Val Met
           100             105             110

25     Glu Ile Asn Arg Glu Val Glu Glu Pro Pro Lys Lys Pro Ser Ala Phe
           115             120             125

      Lys Pro Ala Ile Glu Met Gln Asn Ser Val Pro Asn Lys Ala Phe Glu
           130             135             140

30     Leu Lys Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp Pro Met Phe Pro Pro Glu
           145             150             155             160

      Ser Lys Gln Lys Asp Tyr Glu Glu Asn Ser Trp Asp Ser Glu Ser Leu
           165             170             175

35     Cys Glu Thr Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Leu Pro Lys Ala Thr His
           180             185             190

      Gln Lys Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Gly Lys Asn Arg
           195             200             205

      Phe Leu Phe Lys Asn Gln Leu Thr Glu Tyr Phe Ser Lys Leu Met Arg
           210             215             220

45     Arg Asp Ile Leu
           225

```

50 <210> 27

<211> 154

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

<220>

<221> incierto

<222> (148)

60

<223> Xaa = cualquier aminoácido

65



# ES 2 281 416 T3

<400> 27

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 5  | Met Arg Leu His Pro Trp Arg Lys Glu His Leu Thr Gln Leu Lys Ala | 5   | 10  | 15  |
|    | Trp Trp Lys Lys His Leu Met Arg Leu His Pro Trp Trp Lys Glu His | 20  | 25  | 30  |
| 10 | Leu Thr Arg Leu Lys Ala Trp Trp Lys Lys His Leu Met Arg Leu His | 35  | 40  | 45  |
|    | Pro Trp Trp Arg Glu His Leu Thr Lys Phe Asn Val Trp Arg Lys Arg | 50  | 55  | 60  |
| 15 | His Leu Glu Ser Ser Asn Ser Gln Gln Lys Lys His Leu Gly Lys Leu | 65  | 70  | 75  |
|    | Arg Val Leu Gln Lys Lys His Leu Arg Asn Leu Arg Gly Gln Gln Lys | 85  | 90  | 95  |
| 20 | Glu Asp Leu Gly Arg Ser His Gly Arg Lys Lys Met Thr Gln Leu Arg | 100 | 105 | 110 |
| 25 | Gln Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys | 115 | 120 | 125 |
|    | Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys | 130 | 135 | 140 |
| 30 | Lys Lys Lys Xaa Lys Lys Lys Lys Lys Lys                         | 145 | 150 |     |

35 <210> 28

<211> 466

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> incierto

45 <222> (329)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

50

55

60

65

# ES 2 281 416 T3

<400> 28

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Met | Ser | Pro | Ala | Lys | Glu | Thr | Ser | Glu | Lys | Phe | Thr | Trp | Ala | Ala | Lys |  |
|    |     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| 5  | Gly | Arg | Pro | Arg | Lys | Ile | Ala | Trp | Glu | Lys | Lys | Glu | Thr | Pro | Val | Lys |  |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
|    | Thr | Gly | Cys | Val | Ala | Arg | Val | Thr | Ser | Asn | Lys | Thr | Lys | Val | Leu | Glu |  |
| 10 |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
|    | Lys | Gly | Arg | Ser | Lys | Met | Ile | Ala | Cys | Pro | Thr | Lys | Glu | Ser | Ser | Thr |  |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| 15 | Lys | Ala | Ser | Ala | Asn | Asp | Gln | Arg | Phe | Pro | Ser | Glu | Ser | Lys | Gln | Glu |  |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
|    | Glu | Asp | Glu | Glu | Tyr | Ser | Cys | Asp | Ser | Arg | Ser | Leu | Phe | Glu | Ser | Ser |  |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| 20 | Ala | Lys | Ile | Gln | Val | Cys | Ile | Pro | Glu | Ser | Ile | Tyr | Gln | Lys | Val | Met |  |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
|    | Glu | Ile | Asn | Arg | Glu | Val | Glu | Glu | Pro | Pro | Lys | Lys | Pro | Ser | Ala | Phe |  |
| 25 |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
|    | Lys | Pro | Ala | Ile | Glu | Met | Gln | Asn | Ser | Val | Pro | Asn | Lys | Ala | Phe | Glu |  |
|    |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| 30 | Leu | Lys | Asn | Glu | Gln | Thr | Leu | Arg | Ala | Asp | Pro | Met | Phe | Pro | Pro | Glu |  |
|    | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |  |
|    | Ser | Lys | Gln | Lys | Asp | Tyr | Glu | Glu | Asn | Ser | Trp | Asp | Ser | Glu | Ser | Leu |  |
|    |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| 35 | Cys | Glu | Thr | Val | Ser | Gln | Lys | Asp | Val | Cys | Leu | Pro | Lys | Ala | Thr | His |  |
|    |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
|    | Gln | Lys | Glu | Ile | Asp | Lys | Ile | Asn | Gly | Lys | Leu | Glu | Glu | Ser | Pro | Asn |  |
| 40 |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
|    | Lys | Asp | Gly | Leu | Leu | Lys | Ala | Thr | Cys | Gly | Met | Lys | Val | Ser | Ile | Pro |  |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| 45 | Thr | Lys | Ala | Leu | Glu | Leu | Lys | Asp | Met | Gln | Thr | Phe | Lys | Ala | Glu | Pro |  |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     | 240 |  |
|    | Pro | Gly | Lys | Pro | Ser | Ala | Phe | Glu | Pro | Ala | Thr | Glu | Met | Gln | Lys | Ser |  |
|    |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| 50 | Val | Pro | Asn | Lys | Ala | Leu | Glu | Leu | Lys | Asn | Glu | Gln | Thr | Leu | Arg | Ala |  |
|    |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
|    | Asp | Glu | Ile | Leu | Pro | Ser | Glu | Ser | Lys | Gln | Lys | Asp | Tyr | Glu | Glu | Asn |  |
| 55 |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
|    | Ser | Trp | Asp | Thr | Glu | Ser | Leu | Cys | Glu | Thr | Val | Ser | Gln | Lys | Asp | Val |  |
|    |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| 60 | Cys | Leu | Pro | Lys | Ala | Ala | His | Gln | Lys | Glu | Ile | Asp | Lys | Ile | Asn | Gly |  |
|    | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
|    | Lys | Leu | Glu | Gly | Ser | Pro | Gly | Lys | Xaa | Gly | Leu | Leu | Lys | Ala | Asn | Cys |  |
|    |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| 65 | Gly | Met | Lys | Val | Ser | Ile | Pro | Thr | Lys | Ala | Leu | Glu | Leu | Met | Asp | Met |  |
|    |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |  |

# ES 2 281 416 T3

Gln Thr Phe Lys Ala Glu Pro Pro Glu Lys Pro Ser Ala Phe Glu Pro  
 355 360 365  
 5 Ala Ile Glu Met Gln Lys Ser Val Pro Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys  
 370 375 380  
 Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp Glu Ile Leu Pro Ser Glu Ser Lys  
 385 390 395 400  
 10 Gln Lys Asp Tyr Glu Glu Ser Ser Trp Asp Ser Glu Ser Leu Cys Glu  
 405 410 415  
 Thr Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Leu Pro Lys Ala Ala His Gln Lys  
 420 425 430  
 15 Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Gly Lys Asn Arg Phe Leu  
 435 440 445  
 20 Phe Lys Asn His Leu Thr Lys Tyr Phe Ser Lys Leu Met Arg Lys Asp  
 450 455 460  
 Ile Leu  
 465  
 25  
 <210> 29  
 <211> 445  
 30 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 29  
 35  
 Lys Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Gly Ser Pro Val Lys  
 5 10 15  
 40 Asp Gly Leu Leu Lys Ala Asn Cys Gly Met Lys Val Ser Ile Pro Thr  
 20 25 30  
 Lys Ala Leu Glu Leu Met Asp Met Gln Thr Phe Lys Ala Glu Pro Pro  
 35 40 45  
 45 Glu Lys Pro Ser Ala Phe Glu Pro Ala Ile Glu Met Gln Lys Ser Val  
 50 55 60  
 Pro Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp  
 65 70 75 80  
 50 Glu Ile Leu Pro Ser Glu Ser Lys Gln Lys Asp Tyr Glu Glu Ser Ser  
 85 90 95  
 55 Trp Asp Ser Glu Ser Leu Cys Glu Thr Val Ser Gln Lys Asp Val Cys  
 100 105 110  
 Leu Pro Lys Ala Ala His Gln Lys Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly Lys  
 115 120 125  
 60 Leu Glu Glu Ser Pro Asp Asn Asp Gly Phe Leu Lys Ala Pro Cys Arg  
 130 135 140  
 65

# ES 2 281 416 T3

|    |                                                                 |             |
|----|-----------------------------------------------------------------|-------------|
|    | Met Lys Val Ser Ile Pro Thr Lys Ala Leu Glu Leu Met Asp Met Gln |             |
|    | 145                                                             | 150 155 160 |
| 5  | Thr Phe Lys Ala Glu Pro Pro Glu Lys Pro Ser Ala Phe Glu Pro Ala |             |
|    |                                                                 | 165 170 175 |
|    | Ile Glu Met Gln Lys Ser Val Pro Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys Asn |             |
|    |                                                                 | 180 185 190 |
| 10 | Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp Gln Met Phe Pro Ser Glu Ser Lys Gln |             |
|    |                                                                 | 195 200 205 |
|    | Lys Lys Val Glu Glu Asn Ser Trp Asp Ser Glu Ser Leu Arg Glu Thr |             |
| 15 |                                                                 | 210 215 220 |
|    | Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Val Pro Lys Ala Thr His Gln Lys Glu |             |
|    | 225                                                             | 230 235 240 |
| 20 | Met Asp Lys Ile Ser Gly Lys Leu Glu Asp Ser Thr Ser Leu Ser Lys |             |
|    |                                                                 | 245 250 255 |
|    | Ile Leu Asp Thr Val His Ser Cys Glu Arg Ala Arg Glu Leu Gln Lys |             |
|    |                                                                 | 260 265 270 |
| 25 | Asp His Cys Glu Gln Arg Thr Gly Lys Met Glu Gln Met Lys Lys Lys |             |
|    |                                                                 | 275 280 285 |
|    | Phe Cys Val Leu Lys Lys Lys Leu Ser Glu Ala Lys Glu Ile Lys Ser |             |
| 30 |                                                                 | 290 295 300 |
|    | Gln Leu Glu Asn Gln Lys Val Lys Trp Glu Gln Glu Leu Cys Ser Val |             |
|    | 305                                                             | 310 315 320 |
| 35 | Arg Leu Thr Leu Asn Gln Glu Glu Glu Lys Arg Arg Asn Ala Asp Ile |             |
|    |                                                                 | 325 330 335 |
|    | Leu Asn Glu Lys Ile Arg Glu Glu Leu Gly Arg Ile Glu Glu Gln His |             |
|    |                                                                 | 340 345 350 |
| 40 | Arg Lys Glu Leu Glu Val Lys Gln Gln Leu Glu Gln Ala Leu Arg Ile |             |
|    |                                                                 | 355 360 365 |
|    | Gln Asp Ile Glu Leu Lys Ser Val Glu Ser Asn Leu Asn Gln Val Ser |             |
| 45 |                                                                 | 370 375 380 |
|    | His Thr His Glu Asn Glu Asn Tyr Leu Leu His Glu Asn Cys Met Leu |             |
|    | 385                                                             | 390 395 400 |
| 50 | Lys Lys Glu Ile Ala Met Leu Lys Leu Glu Ile Ala Thr Leu Lys His |             |
|    |                                                                 | 405 410 415 |
|    | Gln Tyr Gln Glu Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Glu Asp Ile Lys Ile Leu |             |
|    |                                                                 | 420 425 430 |
| 55 | Lys Glu Lys Asn Ala Glu Leu Gln Met Thr Pro Arg Ala             |             |
|    |                                                                 | 435 440 445 |

60 <210> 30  
 <211> 578  
 <212> DNA  
 <213> Ser humano

65

# ES 2 281 416 T3

<400> 30

```

5      cttgccttct cttaggcttt gaagcatttt tgtctgtgct cctgatctt caggtcacca      60
      ccatgaagtt cttagcagtc ctggtactct tgggagtttc catctttctg gtctctgccc      120
      agaatccgac aacagctgct ccagctgaca cgtatccagc tactggtcct gctgatgatg      180
      aagcccctga tgctgaaacc actgctgctg caaccactgc gaccactgct gctcctacca      240
      ctgcaaccac cgctgcttct accactgctc gtaaagacat tccagtttta cccaaatggg      300
10     ttggggatct cccgaatggg agagtgtgtc cctgagatgg aatcagcttg agtcttctgc      360
      aattggtcac aactattcat gtttcctgtg atttcatcca actacttacc ttgcctacga      420
      tatccccttt atctctaata agtttatttt ctttcaaata aaaaataaact atgagcaaca      480
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      540
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa      578

```

15

<210> 31

<211> 90

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

25

30

35

```

      Met Lys Phe Leu Ala Val Leu Val Leu Leu Gly Val Ser Ile Phe Leu
      1      5      10      15
      Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Thr Ala Ala Pro Ala Asp Thr Tyr Pro
      20      25      30
30     Ala Thr Gly Pro Ala Asp Asp Glu Ala Pro Asp Ala Glu Thr Thr Ala
      35      40      45
      Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ala Pro Thr Thr Ala Thr Thr Ala
      50      55      60
      Ala Ser Thr Thr Ala Arg Lys Asp Ile Pro Val Leu Pro Lys Trp Val
      65      70      75      80
      Gly Asp Leu Pro Asn Gly Arg Val Cys Pro
      85      90

```

40 <210> 32

<211> 3101

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 32

50

55

60

65

```

      tgttggggcc tcagcctccc aagtagctgg gactacaggt gcctgccacc acgccagct      60
      aattttttgt atatttttta gtagagacgg ggtttcacgg tggctcfaat ctcctgacct      120
      cgtgatctgc cagccttggc ctcccaaagt gtattctctt tttattatta ttattatttt      180
      tgagatggag tctgtctctg tcgccagggc tggagtgcag tgggtcgatc tctgctcact      240
      gcaagctccg cctcctgggt tcatgccatt ctcctgcctc agcctcccga gtagctggga      300
      ctacaggccc ctgccaccac acccggctaa tttttgtat ttttagtaga gacagggttt      360
      caccatgta gccagggtgg tctctatctt ctgacctcgt gatccgcctg cctcagctct      420
      tcaaagtgtc gggattacag gcgtgagcca ccgcgaccag ccaactattg ctgtttattt      480
      ttaaataat ttaaagaaa caattagatt tgttttcttt ctcatcttt tacttctact      540
      cttcatgtat gtataattat atttgtgttt tctattacct tttctccttt tactgtattg      600
      gactataata attgtgctca ctaatttctg ttcactaata ttatcagctt agataatact      660
      ttaattttta acttatatat tgagtattaa attgatcagt tttatttgta attatctatc      720
      ttccgcttgg ctgaatataa cttcttaagc ttataacttc ttgttctttc catgttattt      780
      ttttcttttt ttaaatgtat tgaatttctt ctgacactca ttctagtaac ttttttctcg      840
      gtgtgcaacg taagttataa tttgtttctc agatttgaga tctgccataa gtttgaggct      900
      ttattttttt tttttatttg ctttatggca agtcggacaa cctgcatgga tttggcatca      960

```

# ES 2 281 416 T3

|    |             |             |            |             |            |             |      |
|----|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
|    | atgtagtcac  | ccatatctaa  | gagcagcact | tgtttcttag  | catgatgagt | tgtttctgga  | 1020 |
|    | ttgtttcttt  | attttactta  | tattcctggg | agattcctat  | attttccctt | caactctatt  | 1080 |
|    | cagcattttt  | ggaattctta  | ggactttctg | agaatttttag | ctttctgtat | taaatgtttt  | 1140 |
| 5  | taatgagtat  | tgcattttct  | caaaaagcac | aaatatcaat  | agtgtacaca | tgaggaaaac  | 1200 |
|    | tatatatata  | ttctgttgca  | gatgacagca | tctcataaca  | aaatcctagt | tacttcattt  | 1260 |
|    | aaaagacagc  | tctcctccaa  | tatactatga | ggtaacaaaa  | atttgtagt  | tgtaattttt  | 1320 |
|    | ttaatatatt  | aaaactcatc  | ttacattgtg | cacaaatttc  | tgaagtgata | atacttcact  | 1380 |
|    | gtttttctat  | agaagtaact  | taatatgtgc | aaaattactt  | atttgaattt | agggtttggc  | 1440 |
| 10 | tttcatcata  | tacttcctca  | ttaacatttc | cctcaatcca  | taaatgcaat | ctcagtttga  | 1500 |
|    | atcttccatt  | taaccagaa   | gttaattttt | aaaaccttaa  | taaaatttga | atgtagctag  | 1560 |
|    | atattatttg  | ttggttacat  | attagtcaat | aatttatatt  | acttacaatg | atcagaaaat  | 1620 |
|    | atgatctgaa  | tttctgctgt  | cataaattca | ataacgtatt  | ttaggcctaa | acctttccat  | 1680 |
|    | ttcaaatcct  | tgggtctggt  | aattgaaaat | aatcattatc  | ttttgttttc | tgcccaaaaa  | 1740 |
| 15 | tgtctgccat  | ttatttctat  | ccctaattag | tcaaaccttc  | taataaatgt | atttaacgtt  | 1800 |
|    | aatgatgttt  | atttgcttgt  | tgtatactaa | aaccattagt  | ttctataatt | taaatgtcac  | 1860 |
|    | ctaatatgag  | tgaaaatgtg  | tcagaggctg | gggaagaatg  | tggttgaga  | aagggaaggt  | 1920 |
|    | gttgatcaaa  | aagtacccaa  | gtttcagtta | cacaggaggc  | atgagattga | tctagtgcac  | 1980 |
|    | aaaatgatga  | gtataataaa  | taataatgca | ctgtatat    | tgaaattgct | aaaagtagat  | 2040 |
| 20 | ttaaaattga  | tttacataat  | attttacata | tttataaagc  | acatgcaata | tggtgttaca  | 2100 |
|    | tgtatagaat  | gtgcaacgat  | caagtcaggg | tatctgtggt  | atccaccact | ttgagcattt  | 2160 |
|    | atcgattcta  | tatgtcagga  | acatttcaag | ttatctgttc  | tagcaaggaa | atataaaaata | 2220 |
|    | catttatagtt | aactatggcc  | tatctacagt | gcaactaaac  | actagatttt | attccttttc  | 2280 |
|    | aactgtgggt  | ttgtattcat  | ttaccacctt | cttttctac   | ccacacactg | ccacacactg  | 2340 |
| 25 | tgccgggctt  | caggcatata  | ctattctact | gtctgtctct  | gtaaggatta | tcattttagc  | 2400 |
|    | ttccacatat  | gagagaatgc  | atgcaaagtt | tttctttcca  | tgtctggctt | atttcactta  | 2460 |
|    | acaaaatgac  | ctccgcttcc  | atccatgtta | tttatattac  | ccaatagtgt | tcataaatat  | 2520 |
|    | atatacacac  | atatatacca  | cattgcattt | gtccaattat  | tcattgacgg | aaactgggta  | 2580 |
|    | atgttatatc  | gttgctattg  | tgaatagtgc | tgcaataaac  | acgcaagtgg | ggatataatt  | 2640 |
| 30 | tgaagagttt  | ttttgttgat  | gttccataca | aattttaaga  | ttgttttgct | tatgtttgtg  | 2700 |
|    | aaaatggcgt  | tagtatattt  | atagagattg | cattgaatct  | gtagattgct | ttgggtaagt  | 2760 |
|    | atggttattt  | tgatgggtatt | aattttttca | ttccatgaag  | atgagatgct | tttccatttg  | 2820 |
|    | tttctgtcct  | ctacattttc  | tttcatcaaa | gttttgttgt  | atttttgaag | tagatgtatt  | 2880 |
|    | tcaccttata  | gatcaagtgt  | attccctaaa | tattttattt  | ttgtagctat | tgtagatgaa  | 2940 |
| 35 | attgccttct  | cgattttctt  | ttcaactta  | tcattattag  | tgtagtgaaa | tgtagtgaaa  | 3000 |
|    | ttttatttgt  | tgggtttttaa | tcaaaaactg | tattaaactt  | agagtttttt | gtggagtttt  | 3060 |
|    | taagtttttc  | tagatataag  | atcatgacat | ctaccaaaaa  | a          |             | 3101 |

40 <210> 33  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> cebador de PCR

50 <400> 33

tgccccctcg gaagct

16

55 <210> 34  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Cebador de PCR

65 <400> 34

cgtttctgaa gggacatctg atc

23

## ES 2 281 416 T3

|    |                                          |    |
|----|------------------------------------------|----|
|    | <210> 35                                 |    |
|    | <211> 30                                 |    |
|    | <212> DNA                                |    |
| 5  | <213> Secuencia artificial               |    |
|    | <220>                                    |    |
|    | <223> Cebador de PCR                     |    |
| 10 | <400> 35                                 |    |
|    | ttgcagccaa gtaggagtg aagagatgca          | 30 |
| 15 | <210> 36                                 |    |
|    | <211> 24                                 |    |
|    | <212> DNA                                |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial               |    |
|    | <220>                                    |    |
|    | <223> Cebador de PCR                     |    |
| 25 | <400> 36                                 |    |
|    | aagcctcaga gtccttcag tatg                | 24 |
| 30 | <210> 37                                 |    |
|    | <211> 35                                 |    |
|    | <212> DNA                                |    |
| 35 | <213> Secuencia artificial               |    |
|    | <220>                                    |    |
| 40 | <223> Cebador de PCR                     |    |
|    | <400> 37                                 |    |
|    | ttcaaatata agtgaagaaa aaattagtag atcaa   | 35 |
| 45 | <210> 38                                 |    |
|    | <211> 37                                 |    |
|    | <212> DNA                                |    |
| 50 | <213> Secuencia artificial               |    |
|    | <220>                                    |    |
| 55 | <223> Cebador de PCR                     |    |
|    | <400> 38                                 |    |
| 60 | aatccattgt atcttagaac cgagggattt gtttaga | 37 |
|    | <210> 39                                 |    |
|    | <211> 22                                 |    |
| 65 | <212> DNA                                |    |
|    | <213> Secuencia artificial               |    |

## ES 2 281 416 T3

|    |                                  |  |    |
|----|----------------------------------|--|----|
|    | <220>                            |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR             |  |    |
| 5  | <400> 39                         |  |    |
|    | aaagcagatg gtggttgagg tt         |  | 22 |
| 10 | <210> 40                         |  |    |
|    | <211> 22                         |  |    |
|    | <212> DNA                        |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial       |  |    |
| 15 | <220>                            |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR             |  |    |
| 20 | <400> 40                         |  |    |
|    | cctgagacca aatggcttct tc         |  | 22 |
| 25 | <210> 41                         |  |    |
|    | <211> 24                         |  |    |
|    | <212> DNA                        |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial       |  |    |
| 30 | <220>                            |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR             |  |    |
| 35 | <400> 41                         |  |    |
|    | attccatgcc ggctgcttct tctg       |  | 24 |
| 40 | <210> 42                         |  |    |
|    | <211> 30                         |  |    |
|    | <212> DNA                        |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial       |  |    |
| 45 | <220>                            |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR             |  |    |
| 50 | <400> 42                         |  |    |
|    | tctggtttct tcattcttta ttcatttatt |  | 30 |
| 55 | <210> 43                         |  |    |
|    | <211> 20                         |  |    |
|    | <212> DNA                        |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial       |  |    |
| 60 | <220>                            |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR             |  |    |
| 65 | <400> 43                         |  |    |
|    | tgccaaggag cggattatct            |  | 20 |



## ES 2 281 416 T3

|    |                                  |    |
|----|----------------------------------|----|
|    | <210> 44                         |    |
|    | <211> 30                         |    |
|    | <212> DNA                        |    |
| 5  | <213> Secuencia artificial       |    |
|    | <220>                            |    |
|    | <223> Cebador de PCR             |    |
| 10 | <400> 44                         |    |
|    | caaccacgtg acaaacactg gaattacagg | 30 |
| 15 | <210> 45                         |    |
|    | <211> 21                         |    |
|    | <212> DNA                        |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial       |    |
|    | <220>                            |    |
|    | <223> Cebador de PCR             |    |
| 25 | <400> 45                         |    |
|    | actggaacgg tgaaggtgac a          | 21 |
| 30 | <210> 46                         |    |
|    | <211> 20                         |    |
|    | <212> DNA                        |    |
| 35 | <213> Secuencia artificial       |    |
|    | <220>                            |    |
| 40 | <223> Cebador de PCR             |    |
|    | <400> 46                         |    |
|    | cggccacatt gtgaacttg             | 20 |
| 45 | <210> 47                         |    |
|    | <211> 23                         |    |
|    | <212> DNA                        |    |
| 50 | <213> Secuencia artificial       |    |
|    | <220>                            |    |
| 55 | <223> Cebador de PCR             |    |
|    | <400> 47                         |    |
|    | cagtcggttg gagcgagcat ccc        | 23 |
| 60 | <210> 48                         |    |
|    | <211> 24                         |    |
| 65 | <212> DNA                        |    |
|    | <213> Secuencia artificial       |    |

## ES 2 281 416 T3

|    |                                     |    |
|----|-------------------------------------|----|
|    | <220>                               |    |
|    | <223> Cebador de PCR                |    |
| 5  | <400> 48                            |    |
|    | tgccatagat gaattgaagg aatg          | 24 |
| 10 | <210> 49                            |    |
|    | <211> 29                            |    |
|    | <212> DNA                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
| 15 | <220>                               |    |
|    | <223> Cebador de PCR                |    |
| 20 | <400> 49                            |    |
|    | tgtcatatat taattgcata aacacctca     | 29 |
| 25 | <210> 50                            |    |
|    | <211> 32                            |    |
|    | <212> DNA                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
| 30 | <220>                               |    |
|    | <223> Cebador de PCR                |    |
| 35 | <400> 50                            |    |
|    | tcctaaccac acggatgaaa ctctgagcaa tg | 32 |
| 40 | <210> 51                            |    |
|    | <211> 28                            |    |
|    | <212> DNA                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
| 45 | <220>                               |    |
|    | <223> Cebador de PCR                |    |
| 50 | <400> 51                            |    |
|    | atcattgaaa attcaaatat aagtgaag      | 28 |
| 55 | <210> 52                            |    |
|    | <211> 30                            |    |
|    | <212> DNA                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
| 60 | <220>                               |    |
|    | <223> Cebador de PCR                |    |
| 65 | <400> 52                            |    |
|    | gtagttgtgc attgaaataa ttatcattat    | 30 |

## ES 2 281 416 T3

|    |                                |    |
|----|--------------------------------|----|
|    | <210> 53                       |    |
|    | <211> 20                       |    |
|    | <212> DNA                      |    |
| 5  | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> Cebador de PCR           |    |
| 10 | <400> 53                       |    |
|    | caattttggt ggagaacccg          | 20 |
| 15 | <210> 54                       |    |
|    | <211> 20                       |    |
|    | <212> DNA                      |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> Cebador de PCR           |    |
| 25 | <400> 54                       |    |
|    | gctgtcggag gtatatggtg          | 20 |
| 30 | <210> 55                       |    |
|    | <211> 28                       |    |
|    | <212> DNA                      |    |
| 35 | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> Cebador de PCR           |    |
| 40 | <400> 55                       |    |
|    | catttcagag agtaacatgg actacaca | 28 |
| 45 | <210> 56                       |    |
|    | <211> 21                       |    |
|    | <212> DNA                      |    |
| 50 | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> Cebador de PCR           |    |
| 55 | <400> 56                       |    |
|    | tctgataaag gccgtacaat g        | 21 |
| 60 | <210> 57                       |    |
|    | <211> 22                       |    |
|    | <212> DNA                      |    |
| 65 | <213> Secuencia artificial     |    |

## ES 2 281 416 T3

|    |                                   |  |    |
|----|-----------------------------------|--|----|
|    | <220>                             |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR              |  |    |
| 5  | <400> 57                          |  |    |
|    | tcacgacttg ctgtttttgc tc          |  | 22 |
| 10 | <210> 58                          |  |    |
|    | <211> 30                          |  |    |
|    | <212> DNA                         |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial        |  |    |
| 15 | <220>                             |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR              |  |    |
| 20 | <400> 58                          |  |    |
|    | atcaaaaaaac aagcatggcc tcacaccact |  | 30 |
| 25 | <210> 59                          |  |    |
|    | <211> 21                          |  |    |
|    | <212> DNA                         |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial        |  |    |
| 30 | <220>                             |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR              |  |    |
| 35 | <400> 59                          |  |    |
|    | gcaagtgccca atgatcagag g          |  | 21 |
| 40 | <210> 60                          |  |    |
|    | <211> 23                          |  |    |
|    | <212> DNA                         |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial        |  |    |
| 45 | <220>                             |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR              |  |    |
| 50 | <400> 60                          |  |    |
|    | atatagactc aggtatacac act         |  | 23 |
| 55 | <210> 61                          |  |    |
|    | <211> 30                          |  |    |
|    | <212> DNA                         |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial        |  |    |
| 60 | <220>                             |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR              |  |    |
| 65 | <400> 61                          |  |    |
|    | tcccatcaga atccaaacaa gaggaagatg  |  | 30 |

## ES 2 281 416 T3

|    |                                       |    |
|----|---------------------------------------|----|
|    | <210> 62                              |    |
|    | <211> 34                              |    |
|    | <212> DNA                             |    |
| 5  | <213> Secuencia artificial            |    |
|    | <220>                                 |    |
|    | <223> Cebador de PCR                  |    |
| 10 | <400> 62                              |    |
|    | aatccattgt atcttagaac cgagggattt gttt | 34 |
| 15 | <210> 63                              |    |
|    | <211> 24                              |    |
|    | <212> DNA                             |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial            |    |
|    | <220>                                 |    |
|    | <223> Cebador de PCR                  |    |
| 25 | <400> 63                              |    |
|    | ccgcttctga caacactaga gate            | 24 |
| 30 | <210> 64                              |    |
|    | <211> 32                              |    |
|    | <212> DNA                             |    |
| 35 | <213> Secuencia artificial            |    |
|    | <220>                                 |    |
|    | <223> Cebador de PCR                  |    |
| 40 | <400> 64                              |    |
|    | cctataaaga tggtatgtac caaaaatgaa gt   | 32 |
| 45 | <210> 65                              |    |
|    | <211> 22                              |    |
|    | <212> DNA                             |    |
| 50 | <213> Secuencia artificial            |    |
|    | <220>                                 |    |
|    | <223> Cebador de PCR                  |    |
| 55 | <400> 65                              |    |
|    | cccctccctc agggatggc cc               | 22 |
| 60 | <210> 66                              |    |
|    | <211> 22                              |    |
|    | <212> DNA                             |    |
| 65 | <213> Secuencia artificial            |    |

## ES 2 281 416 T3

|    |                                      |  |    |
|----|--------------------------------------|--|----|
|    | <220>                                |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR                 |  |    |
| 5  | <400> 66                             |  |    |
|    | ccctttctca cccacacact gt             |  | 22 |
| 10 | <210> 67                             |  |    |
|    | <211> 24                             |  |    |
|    | <212> DNA                            |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |  |    |
| 15 | <220>                                |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR                 |  |    |
| 20 | <400> 67                             |  |    |
|    | tgcattctct catatgtgga agct           |  | 24 |
| 25 | <210> 68                             |  |    |
|    | <211> 33                             |  |    |
|    | <212> DNA                            |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |  |    |
| 30 | <220>                                |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR                 |  |    |
| 35 | <400> 68                             |  |    |
|    | ccgggcctca ggcatatact attctactgt ctg |  | 33 |
| 40 | <210> 69                             |  |    |
|    | <211> 24                             |  |    |
|    | <212> DNA                            |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |  |    |
| 45 | <220>                                |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR                 |  |    |
| 50 | <400> 69                             |  |    |
|    | gacattccag ttttacccaa atgg           |  | 24 |
| 55 | <210> 70                             |  |    |
|    | <211> 23                             |  |    |
|    | <212> DNA                            |  |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |  |    |
| 60 | <220>                                |  |    |
|    | <223> Cebador de PCR                 |  |    |
| 65 | <400> 70                             |  |    |
|    | tgcagaagac tcaagctgat tcc            |  | 23 |

# ES 2 281 416 T3

<210> 71  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 10  
 <400> 71  
  
 tctcaggac acactctacc attcggga 28  
 15  
 <210> 72  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 25  
 <400> 72  
  
 aaatataagt gaagaaaaaa attagtagat 30  
 30  
 <210> 73  
 <211> 503  
 <212> DNA  
 35 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 73  
 40 gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc 60  
 atgaagttgc tgatggteect catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct 120  
 ggctgcccct tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact 180  
 gaatacaaag aactttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat 240  
 gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgaggtgttt 300  
 45 ctgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatttt aactttctgc aagacctttg 360  
 gctcacagaa ctgcagggtg ttggtgagaaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt 420  
 ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg 480  
 tttatttttaa taaattgatg gca 503  
  
 50 <210> 74  
 <211> 301  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*  
 55  
 <400> 74  
  
 cactgctacg caggctctgg ctgcccctta ttggagaatg tgatttccaa gacaatcaat 60  
 ccacaagtgt ctaagactga atacaaagaa cttcttcaag agttcataga cgacaatgcc 120  
 actacaaatg ccatagatga attgaaggaa tgttttctta accaaacgga tgaaactctg 180  
 agcaatgttg aggtgtttat gcaatttaata tatgacagca gtctttgtga tttatttggc 240  
 ggccatcacc atccacatca ctaagggtccc gagctcgaat tctgcagata tccatcacac 300  
 t 301  
 65  
 <210> 75  
 <211> 3282

# ES 2 281 416 T3

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 75

|    |             |             |            |            |             |             |      |
|----|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
|    | gggacagggc  | tgaggatgag  | gagaaccctg | gggaccacga | agaccgtgcc  | ttgcccgga   | 60   |
|    | gtcctgcctg  | taggcctgaa  | ggacttgccc | taacagagcc | tcaacaacta  | cctggtgatt  | 120  |
|    | cctacttcag  | ccccttggtg  | tgagcagctt | ctcaacatga | actacagcct  | ccacttggcc  | 180  |
| 10 | ttcgtgtgtc  | tgagtctctt  | cactgagagg | atgtgcatcc | aggggagtc   | gttcaacgtc  | 240  |
|    | gaggtoggca  | gaagtgcaca  | gctttccctg | cctggctttg | agaacctcac  | agcaggatat  | 300  |
|    | aacaaatttc  | tcaggcccaa  | ttttggtgga | gaaccctgac | agatagcgct  | gactctggac  | 360  |
|    | attgcaagta  | tctctagcat  | ttcagagagt | aacatggact | acacagccac  | catatacctc  | 420  |
|    | cgacagcgct  | ggatggacca  | gcggctggtg | tttgaaggca | acaagagctt  | cactctggat  | 480  |
| 15 | gcccgcctcg  | tggagttcct  | ctgggtgcca | gatacttaca | ttgtggagtc  | caagaagtcc  | 540  |
|    | ttcctccatg  | aagtcactgt  | gggaaacagg | ctcatccgcc | tcttctccaa  | tggcacggtc  | 600  |
|    | ctgtatgccc  | tcagaatcac  | gacaactggt | gcatgtaaca | tggatctgtc  | taaatacccc  | 660  |
|    | atggacacac  | agacatgcaa  | gttgcagctg | gaaagctggg | gctatgatgg  | aaatgatgtg  | 720  |
|    | gagttcacct  | ggctgagagg  | gaacgactct | gtcgtgggac | tggaaacacct | gcggcttgct  | 780  |
| 20 | cagtacacca  | tagagcggta  | tttcacctta | gtcaccagat | cgcagcagga  | gacaggaaat  | 840  |
|    | tacactagat  | tggctcttaca | gtttgagctt | cggaggaatg | ttctgtattt  | catttctgaa  | 900  |
|    | acctacgttc  | cttccacttt  | cctggtggtg | ttgtcctggg | tttcattttg  | gactctcttc  | 960  |
|    | gattcagttc  | ctgcaagaac  | ctgcattgga | gtgacgaccg | tgttatcaat  | gaccacactg  | 1020 |
|    | atgatcgggt  | cccgcaactc  | tcttcccaac | accaactgct | tcatcaaggc  | catcgatgtg  | 1080 |
| 25 | tacctgggga  | tctgcttttag | ctttgtgttt | ggggccttgc | tagaataatg  | agttgctcac  | 1140 |
|    | tacagttcct  | tacagcagat  | ggcagccaaa | gataggggga | caacaaagga  | agtagaagaa  | 1200 |
|    | gtcagtatta  | ctaataatcat | caacagctcc | atctccagct | ttaaaccgga  | gatcagcttt  | 1260 |
|    | gccagcattg  | aaatttccag  | cgacaacgtt | gaatcacagt | acttgacaat  | gaaaaccagc  | 1320 |
|    | gacaagttca  | agtttgtctt  | ccgagaaaaa | atgggcagga | ttgttgatta  | tttcacaatt  | 1380 |
| 30 | caaaacccca  | gtaatgttga  | tcaactattc | aaactactgt | ttcctttgat  | ttttatgcta  | 1440 |
|    | gccaatgtat  | tttactgggc  | atactacatg | tatttttgag | tcaatgttaa  | atttcttgca  | 1500 |
|    | tgccataggt  | cttcaacagg  | acaagataat | gatgtaaatg | gtatttttag  | ccaagtgtgc  | 1560 |
|    | accacatcc   | aatggtgcta  | caagtgactg | aaataatatt | tgagtctttc  | tgtctaaaga  | 1620 |
|    | atgaagctcc  | aacctattgt  | ctaagctgtg | tagaagtcct | agcattatag  | gatcttgtaa  | 1680 |
| 35 | tagaacaatc  | agttccattc  | tctttcatct | taatacaagg | cattcccatg  | gagcccaaga  | 1740 |
|    | ttacaaatgt  | actcagggct  | gtttattcgg | tggctccctg | gtttgcattt  | acctcatata  | 1800 |
|    | aagaatggga  | aggagacat   | tgggtaaccc | tcaagtgtca | gaagttgttt  | ctaaagtaac  | 1860 |
|    | tatacatggt  | ttttactaaa  | tctctgcagt | gcttataaaa | tacattgttg  | cctattttagg | 1920 |
|    | gagtaacatt  | ttctagtttt  | tgtttctggt | taaaatgaaa | tatgggctta  | tgtcaattca  | 1980 |
| 40 | ttggaagtca  | atgcactaac  | tcaataccaa | gatgagtttt | taaataatga  | atattattta  | 2040 |
|    | ataccacaac  | agaattatcc  | ccaatttcca | ataagtccta | tcattgaaaa  | ttcaaatata  | 2100 |
|    | agtgaagaaa  | aaattagtag  | atcaacaatc | taaacaaaac | cctcggttct  | aagatacaat  | 2160 |
|    | ggattcccca  | tactggaagg  | actctgaggc | tttattcccc | cactatgcat  | atcttatcat  | 2220 |
|    | tttattatta  | tacacacatc  | catcctaaac | tatactaaag | cccttttccc  | atgcatggat  | 2280 |
| 45 | ggaaatggaa  | gatttttttg  | taacttggtc | tagaagtctt | aatatgggct  | gttgccatga  | 2340 |
|    | aggcttgtag  | aatttgagtc  | attttctagc | tgcctttatt | cacatagtga  | tggggtacta  | 2400 |
|    | aaagtactgg  | gttgactcag  | agagtgcgtg | tcattctgtc | attgctgcta  | ctctaaccat  | 2460 |
|    | gagcaacact  | ctcccagtg   | cagatccctt | gtatcattcc | aagaggagca  | ttcatccctt  | 2520 |
|    | tgtcttaatg  | atcaggaatg  | atgcttatta | gaaaacaaac | tgtctgaccc  | aggaacaagt  | 2580 |
| 50 | ggcttagctt  | aagtaaaact  | ggctttgctc | agatccctga | tccttccagc  | tggctgctc   | 2640 |
|    | tgagtggctt  | atcccgcatg  | agcaggagcg | tgtctggcct | gagtactgaa  | ctttctgagt  | 2700 |
|    | aacaatgaga  | cacgtttacag | aacctatggt | cagggtgcgg | gtgagctgcc  | ctctccaaat  | 2760 |
|    | ccagtcagag  | atgcacattc  | ctcggccagt | ctcagccaac | agtaccaaaa  | gtgatttttg  | 2820 |
|    | agtggtgccag | ggtaaaaggct | tccagttcag | cctcagttat | tttagacaat  | ctcgccatct  | 2880 |
| 55 | ttaatctctt  | agcttctctg  | tctaataaat | gcacggcttt | acctttctct  | tcagaaataa  | 2940 |
|    | accaaggctc  | taaaagatga  | tttcccttct | gtaactccct | agagccacag  | gttctcatte  | 3000 |
|    | cttttcccat  | tatacttctc  | acaattcagt | ttctatgagt | ttgatcacct  | gattttttta  | 3060 |
|    | acaaaatatt  | tctaacggga  | atgggtggga | gtgctggtga | aaagagatga  | aatgtggttg  | 3120 |
|    | tatgagccaa  | tcatatttgt  | gattttttta | aaaaagttta | aaaggaaata  | tctgttctga  | 3180 |
| 60 | aacccactt   | aagcattgtt  | tttatataaa | aacaatgata | aagatgtgaa  | ctgtgaaata  | 3240 |
|    | aatataccat  | attagctacc  | caccaaaaaa | aaaaaaaaaa | aa          |             | 3282 |

<210> 76

65 <211> 463

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*



# ES 2 281 416 T3

<400> 76

```

tagaattcag cggccgctta attctagaag tccaaatcac tcattggttg tgaaagctga    60
gctcacagca aaacaagcca ccatgaagct gtcggtgtgt ctccgtgctg tcacgctggc    120
5 cctctgctgc taccaggcca atgccgagtt ctgccagct cttgtttctg agctgttaga    180
cttcttcttc attagtgaac ctctgttcaa gttaagtctt gccaaatttg atgccctcc    240
ggaagctggt gcagccaagt taggagtgaa gagatgcacg gatcagatgt cccttcagaa    300
acgaagcctc attgcggaag tcctggtgaa aatattgaag aaatgtagtg tgtgacatgt    360
aaaaactttc atcctgggtt ccactgtctt tcaatgacac cctgatcttc actgcagaat    420
10 gtaaagggtt caacgtcttg ctttaataaa tcacttgctc tac                      463

```

<210> 77

<211> 90

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 77

```

20 Met Lys Leu Ser Val Cys Leu Leu Leu Val Thr Leu Ala Leu Cys Cys
   1           5           10           15
Tyr Gln Ala Asn Ala Glu Phe Cys Pro Ala Leu Val Ser Glu Leu Leu
   20           25           30
25 Asp Phe Phe Phe Ile Ser Glu Pro Leu Phe Lys Leu Ser Leu Ala Lys
   35           40           45
Phe Asp Ala Pro Pro Glu Ala Val Ala Ala Lys Leu Gly Val Lys Arg
   50           55           60
Cys Thr Asp Gln Met Ser Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ile Ala Glu Val
30 65           70           75           80
Leu Val Lys Ile Leu Lys Lys Cys Ser Val
   85           90

```

35

40

45

50

55

60

65