

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 899**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/12</b>	(2006.01)	<b>C07K 16/40</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/52</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)	<b>A61K 35/12</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/00</b>	(2006.01)	<b>C07K 19/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/62</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/21</b>	(2006.01)	<b>C12N 5/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)	<b>C12Q 1/68</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/32</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00919352 .5**

96 Fecha de presentación: **15.02.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1183348**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.2002**

54 Título: **COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO Y EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA Y MÉTODOS PARA EL USO DE LAS MISMAS.**

30 Prioridad:

**02.04.1999 US 285480**

**23.06.1999 US 339338**

**02.09.1999 US 389681**

**03.11.1999 US 433826**

73 Titular/es:

**CORIXA CORPORATION**  
**CSC, The United States Corporation 2711**  
**Centerville Road**  
**Wilmington, DE 19808, US**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.11.2011**

72 Inventor/es:

**YUQIU, Jiang;**  
**DILLON, Davin, C.;**  
**MITCHAM, Jennifer, Lynn;**  
**XU, Jiangchun y**  
**HARLOCKER, Susan, L.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.11.2011**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 368 899 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

Composiciones para el tratamiento y el diagnóstico de cáncer de mama y métodos para el uso de las mismas

5 **Campo técnico**

El presente invento se refiere, en general, a composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer de mama. Más particularmente, el invento está relacionado con polipéptidos que comprenden al menos una porción de una proteína que se expresa preferentemente en tejido de tumor de mama, y a polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos.

10 Dichos polipéptidos y polinucleótidos pueden ser utilizados en vacunas para el tratamiento del cáncer de mama.

**Fundamento del invento**

15 El cáncer de mama es un problema sanitario significativo para las mujeres de los Estados Unidos y de todo el mundo. Aunque se han realizado progresos en la detección y el tratamiento de la enfermedad, el cáncer de mama sigue siendo la segunda causa principal de muerte relacionada con el cáncer en las mujeres, afectando a más de 180.000 mujeres cada año en los Estados Unidos. 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.

20 No se dispone actualmente de vacuna alguna ni de otro método universalmente satisfactorio para la prevención o el tratamiento del cáncer de mama. El control de la enfermedad se basa actualmente en una combinación de un diagnóstico precoz (por medio de procedimientos de exploración de mama rutinarios) y un tratamiento agresivo, el cual puede incluir uno o más de diversos tratamientos tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal. El programa de tratamiento para un cáncer de mama particular es a menudo seleccionado basándose en una diversidad de parámetros de pronóstico, incluyendo un análisis de marcadores tumorales específicos. Véase, por ejemplo, Porter-Jordan y Lippman, *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 son necesarias mejoras en el tratamiento, el diagnóstico y la prevención de la enfermedad.

30 En el Documento EP1144449 se describe un conjunto de secuencias de cDNA parcialmente solapante y de polipéptidos codificados por ellas, transcritas a partir de tejido de mama. Estas secuencias son descritas como útiles para diagnosticar el cáncer de mama.

35 En consecuencia, existe en la técnica la necesidad de métodos mejorados para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer de mama. El presente invento satisface estas necesidades y proporciona además otras ventajas relacionadas.

**Sumario del invento**

40 El presente invento proporciona compuestos y métodos para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer, tal como el cáncer de mama. En un aspecto, se proporcionan polipéptidos aislados que comprenden al menos una porción de una proteína de tumor de mama o una variante de la misma. Ciertas porciones y otras variantes son inmunogénicas, por lo que la capacidad de la variante para reaccionar con antisueros específicos de proteínas no se ve sustancialmente disminuida.

50 El invento proporciona un polipéptido aislado que comprende al menos una porción de una proteína de tumor de mama, en que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. n° 175, o una variante de dicho polipéptido en que la variante comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por una secuencia polinucleotídica que tiene una identidad de al menos 90% con una secuencia de ID. SEC. n° 175, y la capacidad de la variante para reaccionar con antisueros antigénicamente específicos está potenciada, inalterada o disminuida en menos de un 50% con respecto a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la ID. SEC. n° 175; con tal de que el polipéptido no tenga la secuencia expuesta en la ID. SEC. n° 176 con la sustitución de Val Ile por Asn Ser en las posiciones 316 y 317. En realizaciones específicas, los polipéptidos del invento comprenden al menos una porción de un antígeno tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID. SEC. N° 176.

60 En aspectos relacionados, se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos anteriores, o una porción de los mismos (tal como una porción que codifica al menos 15 restos de aminoácido contiguos de una proteína de tumor de mama). En realizaciones específicas, dichos polinucleótidos comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias proporcionadas en la ID. SEC. n° 175, y variantes de la misma. El presente invento proporciona además vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos anteriores, junto con células huésped transformadas o transfectadas con dichos vectores de expresión. En realizaciones preferidas, las células huésped son seleccionadas del grupo que consiste en células de *E. coli*,

65

levadura y mamífero.

En otro aspecto, el presente invento proporciona proteínas de fusión que comprenden unos polipéptidos primero y segundo del invento o, alternativamente, un polipéptido del invento y un conocido antígeno de tumor de mama.

El presente invento proporciona vacunas, para uso profiláctico o terapéutico, que comprende al menos uno de los polipéptidos anteriores o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido, en combinación con un agente inmunoestimulante. Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los polipéptidos anteriores o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido, y un vehículo fisiológicamente aceptable. También se proporcionan vacunas y composiciones farmacéuticas que comprenden una o más de las anteriores proteínas de fusión.

Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden: (a) un anticuerpo o un fragmento ligante de antígenos del mismo, que se une específicamente a una proteína de tumor de mama; y (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.

Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden: (a) una célula presentadora de antígeno, que expresa un polipéptido como el anteriormente descrito, y (b) un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las células presentadoras de antígeno incluyen células dendríticas, macrófagos, monocitos, fibroblastos y células B.

En aspectos relacionados, el presente invento proporciona vacunas que comprenden: (a) una célula presentadora de antígeno, que expresa un polipéptido como el anteriormente descrito, y (b) un agente inmunoestimulante.

En aún otro aspecto, se describen métodos para inhibir el desarrollo de un cáncer de mama en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos una de las composiciones farmacéuticas y/o vacunas anteriores.

El presente invento proporciona además, en otros aspectos, métodos para eliminar células tumorales de una muestra biológica, que comprende poner una muestra biológica en contacto con células T que reaccionan específicamente con una proteína de tumor de mama, en que la operación de puesta en contacto se lleva a cabo bajo unas condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la eliminación de las células que expresan la proteína, de la muestra.

En aspectos relacionados, se describen métodos para inhibir el desarrollo de un cáncer en un paciente, que comprenden administrar al paciente una muestra biológica tratada del modo anteriormente descrito.

En otros aspectos, se proporcionan además métodos para estimular y/o multiplicar células T específicas para una proteína de tumor de mama, que comprenden poner células T en contacto con uno o más de: (i) un polipéptido como el anteriormente descrito; (ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido; y/o (iii) una célula presentadora de antígeno, que expresa dicho polipéptido; bajo unas condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la estimulación y/o multiplicación de las células T. También se proporcionan poblaciones aisladas de células T que comprenden células T preparadas del modo anteriormente descrito.

En otros aspectos, se describen métodos para inhibir el desarrollo de un cáncer en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad eficaz de una población de células T como la anteriormente descrita.

Se describen métodos para inhibir el desarrollo de un cáncer en un paciente, que comprenden las operaciones de: (a) incubar células T CD4+ y/o CD8+ aisladas de un paciente, con uno o más de: (i) un polipéptido que comprende al menos una porción inmunogénica de una proteína de tumor de mama; (ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido; y (iii) una célula presentadora de antígeno, que expresa dicho polipéptido; y (b) administrar al paciente una cantidad eficaz de las células T proliferadas, e inhibir por ello el desarrollo de un cáncer en el paciente. Las células proliferadas pueden ser clonadas, aunque no es necesario, antes de la administración al paciente.

Los polipéptidos aquí descritos pueden ser útilmente empleados en el diagnóstico y control del cáncer de mama. En un aspecto del presente invento, se proporcionan métodos para detectar un cáncer de mama en un paciente, que comprenden: (a) poner una muestra biológica obtenida del paciente en contacto con un agente ligante que es capaz de unirse a uno de los polipéptidos anteriores; y (b) detectar en la muestra una cantidad de un polipéptido que se une al agente ligante; y (c) comparar la cantidad del polipéptido con un valor de corte predeterminado y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer de mama en el paciente. En realizaciones preferidas, el agente ligante es un anticuerpo, muy preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

En aspectos relacionados, se proporcionan métodos para controlar el progreso de un cáncer de mama en un paciente, que comprenden: (a) poner una muestra biológica obtenida del paciente en contacto con un agente ligante que es capaz de unirse a uno de los polipéptidos anteriores; (b) detectar en la muestra una cantidad de un polipéptido que se une al agente ligante; (c) repetir las operaciones (a) y (b) usando una muestra biológica obtenida

del paciente en un tiempo posterior; y (d) comparar las cantidades de polipéptido detectadas en las operaciones (b) y (c).

5 En aspectos relacionados, el presente invento proporciona anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, que se unen a los polipéptidos del invento, así como kits diagnósticos que comprenden dichos anticuerpos, para inhibir el desarrollo del cáncer de mama. También se describen métodos para utilizar dichos anticuerpos.

10 En otros aspectos, el presente invento proporciona además métodos para determinar la presencia o ausencia de un cáncer de mama en un paciente, que comprenden las operaciones de: 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, preferiblemente mRNA, que se hibrida con el oligonucleótido; y (c) comparar el nivel del polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido, con un valor de corte predeterminado y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer de mama en el paciente. En ciertas realizaciones, la cantidad de mRNA es detectada por medio de 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 en que se emplea una sonda oligonucleotídica que se hibrida con un polinucleótido que codifica un polipéptido como el anteriormente indicado, o con un complemento de dicho polinucleótido.

20 En aspectos relacionados, se proporcionan kits diagnósticos que comprenden los anteriores cebadores o sondas oligonucleotídicos.

25 Estos y otros aspectos del presente invento resultarán evidentes tras la referencia a la descripción detallada siguiente.

**Breve descripción de los identificadores de dibujos y secuencias**

30 La ID. SEC. nº 71 es la determinada secuencia de cDNA de B726P.

La ID. SEC. nº 175 es la determinada secuencia de cDNA de B726P-20.

La ID. SEC. nº 176 es la prevista secuencia de aminoácidos de B726P-20.

35 La ID. SEC. nº 177 es un cebador de PCR.

La ID. SEC. nº 178 es la determinada secuencia de cDNA de B726P-74.

40 La ID. SEC. nº 179 es la prevista secuencia de aminoácidos de B726P-74.

La ID. SEC. nº 180 es la determinada secuencia de cDNA de B726P-79.

La ID. SEC. nº 181 es la prevista secuencia de aminoácidos de B726P-79.

45 La ID. SEC. nº 463 es una secuencia de DNA de consenso de B7226P (a la que se hace referencia como B726P-spliced\_seq\_B726P).

50 La ID. SEC. nº 464 es la determinada secuencia de DNA de una segunda forma de corte y empalme de B7226P (a la que se hace referencia como 27490.seq\_B726P).

La ID. SEC. nº 465 es la determinada secuencia de DNA de una tercera forma de corte y empalme de B7226P (a la que se hace referencia como 27068.seq\_B726P).

55 La ID. SEC. nº 466 es la determinada secuencia de DNA de una segunda forma de corte y empalme de B7226P (a la que se hace referencia como 23113.seq\_B726P).

La ID. SEC. nº 467 es la determinada secuencia de DNA de una segunda forma de corte y empalme de B7226P (a la que se hace referencia como 23103.seq\_B726P).

60 La ID. SEC. nº 468 es la determinada secuencia de DNA de una segunda forma de corte y empalme de B7226P (a la que se hace referencia como 19310.seq\_B726P).

65 La ID. SEC. nº 469 es la prevista secuencia de aminoácidos codificada por el ORF cadena arriba de la ID. SEC. nº 463.

La ID. SEC. nº 470 es la prevista secuencia de aminoácidos codificada por la ID. SEC. nº 464.

La ID. SEC. nº 471 es la prevista secuencia de aminoácidos codificada por la ID. SEC. nº 465.

5 La ID. SEC. nº 472 es la prevista secuencia de aminoácidos codificada por la ID. SEC. nº 466.

La ID. SEC. nº 473 es la prevista secuencia de aminoácidos codificada por la ID. SEC. nº 467.

### Descripción detallada del invento

10 Como se indicó anteriormente, el presente invento se dirige, en general, a composiciones y a su uso para la terapia y el diagnóstico del cáncer, tal como el cáncer de mama. Las composiciones aquí descritas pueden incluir polipéptidos de tumor de mama, polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, agentes ligantes tales como anticuerpos, células presentadoras de antígeno (APCs; del inglés, antigen presenting cells) y/o células del sistema  
15 inmune (por ejemplo, células T). Los polipéptidos del presente invento comprenden generalmente al menos una porción (tal como una porción inmunogénica) de una proteína de tumor de mama o una variante de la misma. Una "proteína de tumor de mama" es una proteína que se expresa en células de tumor de mama en un nivel que es al menos dos veces, y preferiblemente al menos cinco veces, mayor que el nivel de expresión en un tejido normal, según se determina utilizando un ensayo representativo aquí proporcionado. Ciertas proteínas de tumor de mama  
20 son proteínas tumorales que reaccionan detectablemente (en un inmunoensayo, tal como un ELISA o una transferencia Western) con antisueros de un paciente aquejado de cáncer de mama. Los polinucleótidos del invento objetivo comprenden generalmente una secuencia de DNA o RNA que codifica todo, o una porción de, dicho polipéptido, o una secuencia que es complementaria de dicha secuencia. Los anticuerpos son generalmente proteínas del sistema inmune, o fragmentos ligantes de antígeno de las mismas, que son capaces de unirse a un  
25 polipéptido como el anteriormente descrito. Las células presentadoras de antígeno incluyen células dendríticas, macrófagos, monocitos, fibroblastos y células B que expresan un polipéptido como el anteriormente descrito. Las células T que se pueden emplear en dichas composiciones son generalmente células T que son específicas para un polipéptido como el anteriormente descrito.

30 El presente invento se basa en el descubrimiento de proteínas de tumor de mama humanas. En la ID. SEC. nº 175 se proporcionan secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas tumorales específicas.

#### Polinucleótidos de proteínas de tumor de mama

35 Todo polinucleótido que codifique una proteína de tumor de mama o una porción u otra variante de la misma como las aquí descritas queda abarcado por el presente invento. Los polinucleótidos preferidos comprenden al menos 15 nucleótidos consecutivos, preferiblemente al menos 30 nucleótidos consecutivos y más preferiblemente al menos 45 nucleótidos consecutivos, que codifican una porción de una proteína de tumor de mama. Más preferiblemente, un polinucleótido codifica una porción inmunogénica de una proteína de tumor de mama. Los polinucleótidos  
40 complementarios de cualesquiera de dichas secuencias quedan también abarcados por el presente invento. Los polinucleótidos pueden ser de cadena sencilla (codificadores o antisentido) o de cadena doble y pueden ser moléculas de DNA (genómico, cDNA o sintético) o RNA. Las moléculas de RNA incluyen moléculas de HnRNA, que contienen intrones y corresponden a una molécula de DNA según un modo de uno a uno, y moléculas de mRNA, que no contienen intrones. Pueden estar presentes, aunque no es necesario, secuencias codificadoras o no  
45 codificadoras adicionales en un polinucleótido del presente invento, y un polinucleótido puede estar enlazado, 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 de tumor de mama o una porción de la misma) o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las  
50 variantes polinucleotídicas pueden contener una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones para que la inmunogenicidad del polipéptido codificado no resulte disminuida con respecto a la de una proteína tumoral nativa. El efecto sobre la inmunogenicidad del polipéptido codificado puede ser generalmente evaluada del modo aquí descrito. Las variantes presentan preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente 80% y muy preferiblemente una identidad de al menos  
55 aproximadamente 90%, con respecto a una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína nativa de tumor de mama o una porción de la misma. El término "variantes" también abarca genes homólogos de origen xenogénico.

Se dice que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de las dos secuencias es la misma cuando éstas son alineadas para una máxima correspondencia,  
60 como se describe más adelante. Las comparaciones entre dos secuencias se llevan típicamente a cabo comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud secuencial. Como aquí se utiliza, 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 el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez que las dos secuencias están óptimamente alineadas.  
65

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede ser llevado a cabo utilizando el programa Megalign de la colección Lasergene de software para bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, EE.UU.), usando los parámetros por omisión. Este programa realiza diversos esquemas de alineamiento descritos en las referencias siguientes: M. O. Dayhoff (1978), *A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships*, en M. O. Dayhoff (redactor), *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Washington DC, 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; 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; W. J. Wilbur y D. J. Lipman (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 726-730.

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) del 20 por ciento o menos, normalmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones ni supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en que se presentan bases de ácido nucleico o restos de aminoácido idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

Las variantes pueden ser también, o alternativamente, sustancialmente homólogas a un gen nativo o a una porción o complemento del mismo. Dichas variantes polinucleotídicas son capaces de hibridarse bajo condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de DNA presente en la naturaleza que codifica una proteína nativa de tumor de mama (o una secuencia complementaria). Las condiciones moderadamente rigurosas adecuadas 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%.

Quienes tienen una experiencia normal en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como el aquí descrito. Algunos de estos polinucleótidos poseen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían a causa de diferencias en la utilización de codones están específicamente contemplados por el presente invento. 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 deleciones, 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 usando técnicas estándares (tales como hibridación, multiplicación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

Se pueden preparar polinucleótidos usando cualquiera de una diversidad de técnicas. Por ejemplo, se puede identificar un polinucleótido, como se describe más adelante con mayor detalle, explorando una micromatriz de cDNAs para la expresión asociada con tumores (es decir, una expresión que es al menos cinco veces mayor en un tumor de mama que en un tejido normal, según se determina utilizando un ensayo representativo aquí proporcionado). Dichas exploraciones pueden ser llevadas a cabo utilizando una micromatriz de Synteni (Palo Alto, California) 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). Alternativamente, se pueden multiplicar polipéptidos a partir de cDNA preparado a partir de células que expresan las proteínas aquí descritas, tales como células de tumor de mama. Dichos polinucleótidos pueden ser multiplicados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction). Para este procedimiento, los cebadores secuencialmente específicos pueden ser diseñados basándose en las secuencias aquí proporcionadas y pueden ser adquiridos o sintetizados.

Una porción multiplicada puede ser utilizada para aislar un gen de longitud completa a partir de un banco adecuado (por ejemplo, un banco de cDNA de tumor de mama) usando técnicas bien conocidas. En dichas técnicas, se explora un banco (de cDNA o genómico) utilizando uno o más cebadores o sondas polinucleotídicos adecuados para la multiplicación. Preferiblemente, se selecciona un banco por tamaños para incluir moléculas más grandes. También se pueden preferir bancos aleatoriamente cebados para identificar regiones 5' y cadena arriba de genes. Se prefieren bancos genómicos para obtener intrones y extender secuencias 5'.

Para las técnicas de hibridación, se puede etiquetar una secuencia parcial (por ejemplo, por traslado de mellas o marcación de extremos con <sup>32</sup>P) usando técnicas bien conocidas. Luego se explora un banco bacteriano o de

bacteriófagos hibridando filtros que contienen colonias bacterianas desnaturalizadas (o céspedes que contienen placas de fagos) con la sonda etiquetada (véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Se seleccionan y multiplican las placas o colonias de hibridación y se aísla el DNA para un análisis posterior. Se pueden analizar clones de cDNA para determinar la cantidad de secuencia adicional mediante, por ejemplo, una PCR en que se utiliza un cebador de la secuencia parcial y un cebador del vector. Se pueden generar mapas de restricción y secuencias parciales para identificar uno o más clones solapantes. Luego se puede determinar la secuencia completa utilizando técnicas estándares, las cuales pueden implicar la generación de una serie de clones de delección. Las secuencias solapantes resultantes son luego ensambladas en una única secuencia contigua. Se puede generar una molécula de cDNA de longitud completa por ligación de fragmentos adecuados utilizando técnicas bien conocidas.

Alternativamente, hay numerosas técnicas de multiplicación para obtener una secuencia de codificación de longitud completa a partir de una secuencia parcial de cDNA. En dichas técnicas, la multiplicación es llevada generalmente a cabo por medio de PCR. Para llevar a cabo la operación de multiplicación, se puede utilizar cualquiera de una diversidad de kits comercialmente asequibles. Se pueden diseñar cebadores utilizando, por ejemplo, un software bien conocido en la técnica. Los cebadores tienen preferiblemente una longitud de 22-30 nucleótidos, tienen un contenido de GC de al menos 50% y se hibridan con la secuencia diana a temperaturas de aproximadamente 68 °C a 72 °C. La región multiplicada puede ser secuenciada del modo anteriormente descrito, y se pueden ensamblar las secuencias solapantes en una secuencia contigua.

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 circularizado por ligación intramolecular y es utilizado como molde para una PCR con cebadores divergentes procedentes de la región conocida. En un procedimiento alternativo, se pueden recuperar secuencias adyacentes a una secuencia parcial 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 de conector y un segundo cebador específico para la región conocida. En el Documento WO 96/38591 se describe una variación de este procedimiento en 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 (del inglés, rapid amplification of cDNA ends). 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 están en 5' y 3' de 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 PCR") (Parker et al., *Nucl. Acids Res.* 19: 3055-60, 1991). Para obtener una secuencia de cDNA de longitud completa, también se pueden emplear otros métodos en que se usa multiplicación.

En ciertos casos, es posible obtener una secuencia de cDNA de longitud completa por análisis de secuencias proporcionadas en una base de datos de etiquetas de secuencia expresada (EST; del inglés, expressed sequence tag), tal como la disponible en GenBank. Las búsquedas de ESTs solapantes pueden ser llevadas generalmente a cabo usando programas bien conocidos (por ejemplo, búsquedas NCBI BLAST), y dichas ESTs pueden ser utilizadas para generar una secuencia contigua de longitud completa. También se pueden obtener secuencias de DNA de longitud completa por análisis de fragmentos genómicos.

En las ID. SEC. números 71, 175, 178, 180 y 464-468 se proporcionan ciertas secuencias de ácido nucleico de moléculas de cDNA que codifican porciones de proteínas de tumor de mama. Más adelante se describe con detalle el aislamiento de estas secuencias.

Se pueden preparar generalmente variantes polinucleotídicas mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la síntesis química mediante, por ejemplo, la síntesis química de fosoramiditas en fase sólida. También se pueden introducir modificaciones en una secuencia polinucleotídica utilizando técnicas de mutagénesis estándares, tal como la mutagénesis específica del sitio y dirigida a oligonucleótidos (véase Adelman et al., *DNA* 2: 183, 1983). Alternativamente, se pueden generar moléculas de RNA mediante la transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de DNA que codifican una proteína de tumor de mama, o una porción de la misma, con tal de que el DNA se incorpore a un vector con un adecuado promotor de RNA polimerasa (tal como T7 o SP6). Se pueden utilizar ciertas porciones para preparar un polipéptido codificado, como aquí se describe. Además o alternativamente, se puede administrar una porción a un paciente para que se genere *in vivo* el polipéptido codificado (por ejemplo, transfectando células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, con una construcción de cDNA que codifica un polipéptido de tumor de mama, y administrando las células transfectadas al paciente).

También se puede utilizar una porción de una secuencia complementaria de una secuencia de codificación (es decir, un polinucleótido antisentido) como una sonda o para modular la expresión génica. Construcciones de cDNA que se pueden transcribir en RNA antisentido pueden ser también introducidas en células de tejidos para facilitar la producción de RNA antisentido. Se puede utilizar un polinucleótido antisentido, como aquí se describe, para inhibir la expresión de una proteína tumoral. Se puede usar la tecnología antisentido para controlar la expresión génica a

través de la formación de triples hélices, lo que compromete la capacidad de la doble hélice para abrirse suficientemente para la unión de polimerasas, factores de transcripción o moléculas reguladoras [véase Gee et al. en Huber y Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co. (Mt. Kisco, New York, 1994)]. Alternativamente, se puede diseñar una molécula antisentido para que se hibride con una región de control de un gen (por ejemplo, un promotor, un potenciador o un sitio de inicio de la transcripción) y bloquee la transcripción del gen; o para que bloquee la traducción al inhibir la unión de un transcrito a ribosomas.

También se puede diseñar una porción de una secuencia de codificación, o de una secuencia complementaria, como una sonda o cebador para detectar la expresión génica. Se pueden etiquetar sondas con una diversidad de grupos informadores, tales como radionucleidos y enzimas, y tienen preferiblemente una longitud de al menos 10 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de al menos 20 nucleótidos, y aún más preferiblemente una longitud de al menos 30 nucleótidos. Como se indicó anteriormente, los cebadores tienen preferiblemente una longitud de 22-30 nucleótidos.

Todo polinucleótido puede ser adicionalmente modificado para aumentar su estabilidad *in vivo*. Las modificaciones posibles incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueadoras en los extremos 5' y/o 3'; el uso de enlaces fosforotioato o 2'-O-metilicos en lugar de enlaces fosfodiesterasa en la cadena principal; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wybutosina, así como de formas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina modificadas con acetilo, metilo, tio y otros.

Se pueden unir secuencias de nucleótidos como las aquí descritas a una diversidad de otras secuencias de nucleótidos utilizando técnicas de DNA recombinante establecidas. Por ejemplo, se puede clonar un polinucleótido en cualquiera de una diversidad de vectores de clonación, incluyendo plásmidos, fagómidos, derivados del fago lambda, y cósmidos. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores para generación de sondas y vectores de secuenciación. En general, un vector contendrá un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios convenientes para endonucleasas de restricción, y uno o más marcadores seleccionables. Otros elementos dependerán del uso deseado y serán evidentes para quienes tienen una experiencia normal en la técnica.

En ciertas realizaciones, se pueden formular polinucleótidos para permitir su entrada en una célula de un mamífero y su expresión en ella. Dichas formulaciones son particularmente útiles con fines terapéuticos, como se describe más adelante. Quienes tienen una experiencia normal en la técnica apreciarán que hay muchas maneras de conseguir la expresión de un polinucleótido en una célula diana, y se puede emplear cualquier método adecuado. Por ejemplo, se puede incorporar un polinucleótido a un vector vírico tal como, pero sin limitarse a, un adenovirus, virus adenoasociado, retrovirus, o virus vaccinia u otro poxvirus (por ejemplo, el virus de la viruela aviar). También se pueden administrar los polinucleótidos como vectores plasmídicos desnudos. Las técnicas para incorporar DNA a dichos vectores son bien conocidas por quienes tienen una experiencia normal en este campo técnico. Un vector retrovírico puede además transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable (para facilitar la identificación o selección de células transducidas) y/o un componente para transporte dirigido, tal como un gen que codifica un ligando para un receptor de una célula diana específica, para hacer que el vector sea específico de la diana. El transporte dirigido puede ser llevado también a cabo usando un anticuerpo, mediante métodos conocidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica.

Otras formulaciones para fines terapéuticos incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, glóbulos y sistemas de base lipídica que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido para uso como vehículo de distribución *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (es decir, una vesícula artificial de membrana). La preparación y el uso de dichos sistemas son bien conocidos en la técnica.

#### 50 Polipéptidos de tumor de mama

En el contexto del presente invento, los polipéptidos pueden comprender al menos una porción inmunogénica de una proteína de tumor de mama o una variante de la misma, como aquí se describe. Como se indicó anteriormente, una "proteína de tumor de mama" es una proteína que es expresada por células de tumor de mama. Las proteínas que son proteínas de tumor de mama también reaccionan detectablemente en un inmunoensayo (tal como un ELISA) con antisueros de un paciente con cáncer de mama. Los polipéptidos, como aquí se describen, pueden tener cualquier longitud. Pueden estar presentes secuencias adicionales procedentes de la proteína nativa y/o secuencias heterólogas, y dichas secuencias pueden poseer (aunque no es necesario) otras propiedades inmunogénicas o antigénicas.

Como aquí se utiliza, una "porción inmunogénica" es una porción de una proteína que es reconocida por (es decir, se une específicamente a) un receptor antigénico superficial de célula B y/o célula T. Dichas porciones inmunogénicas comprenden generalmente al menos 5 restos de aminoácido, más preferiblemente al menos 10, y aún más preferiblemente al menos 20, restos de aminoácido de una proteína de tumor de mama o una variante de la misma. Ciertas porciones inmunogénicas preferidas incluyen péptidos en que se han suprimido una secuencia líder

N-terminal y/o un dominio transmembranal. Otras porciones inmunogénicas preferidas pueden contener una pequeña supresión N-terminal y/o C-terminal (por ejemplo, 1-30 aminoácidos, preferiblemente 5-15 aminoácidos) con respecto a la proteína madura.

5 Se pueden identificar generalmente porciones inmunogénicas usando técnicas bien conocidas, tales como las resumidas en Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª edición, 243-247 (Raven Press, 1993) y las referencias allí citadas. Dichas técnicas incluyen la exploración de polipéptidos en cuanto a la capacidad para reaccionar con anticuerpos, antisueros y/o líneas o clones de células T antigénicamente específicos. Como aquí se usan, los antisueros y anticuerpos son "antigénicamente específicos" si se unen específicamente a un antígeno (es decir, reaccionan con la proteína en un ELISA u otro inmunoensayo y no reaccionan detectablemente con proteínas no relacionadas). Dichos antisueros y anticuerpos pueden ser preparados del modo aquí descrito, y utilizando técnicas bien conocidas. Una porción inmunogénica de una proteína nativa de tumor de mama es una porción que reacciona con dichos antisueros y/o células T en un nivel que no es sustancialmente inferior a la reactividad del polipéptido de longitud completa (por ejemplo, en un ELISA y/o un ensayo de reactividad de células T). Dichas porciones inmunogénicas pueden reaccionar en dichos ensayos en un nivel que es similar o superior a la reactividad del polipéptido de longitud completa. Dichas exploraciones pueden ser llevadas generalmente a cabo usando métodos bien conocidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica, tales como los descritos en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Por ejemplo, un polipéptido puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido y ser puesto en contacto con sueros de pacientes para permitir la unión de anticuerpos de los sueros con el polipéptido inmovilizado. Luego se pueden separar los sueros no unidos y detectar los anticuerpos unidos utilizando, por ejemplo, proteína A marcada con <sup>125</sup>I.

Como se indicó anteriormente, una composición puede comprender una variante de una proteína nativa de tumor de mama. Una "variante" polipeptídica, como aquí se usa, es un polipéptido que difiere de una proteína nativa de tumor de mama en una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones, de tal modo que la inmunogenicidad del polipéptido no resulta sustancialmente disminuida. En otras palabras, la capacidad de una variante para reaccionar con antisueros antigénicamente específicos puede resultar potenciada o inalterada con respecto a la de la proteína nativa, o puede ser disminuida en menos del 50%, y preferiblemente menos del 20%, con respecto a la de la proteína nativa. Dichas variantes pueden ser generalmente identificadas modificando una de las secuencias polipeptídicas anteriores y evaluando, con anticuerpos o antisueros antigénicamente específicos como los aquí descritos, la reactividad del polipéptido modificado. Las variantes preferidas incluyen aquellas en que se han separado una o más porciones, tal como una secuencia líder N-terminal o un dominio transmembranal. Otras variantes preferidas incluyen las variantes en que se ha separado una pequeña porción (por ejemplo, 1-30 aminoácidos, preferiblemente 5-15 aminoácidos) de los extremos N y/o C de la proteína madura.

Las variantes polipeptídicas presentan preferiblemente una identidad (determinada del modo anteriormente descrito) de al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 90% y muy preferiblemente de al menos aproximadamente 95%, con respecto a los polipéptidos identificados.

Preferiblemente, una variante contiene sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de forma que un experto en la técnica de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanecieran sustancialmente inalteradas. Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar, en general, basándose en la similitud de la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicocola y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser y thr; (2) cys, ser, tyr y thr; (3) val, ile, leu, met, ala y phe; (4) lys, arg e his; y (5) phe, tyr, trp e his. Un variante puede contener también, o alternativamente, cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, supresión o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes pueden ser también (o alternativamente) modificadas mediante, por ejemplo, la supresión o adición de aminoácidos que ejercen una influencia mínima sobre la inmunogenicidad, estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido.

Como se indicó anteriormente, los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige cotraduccionalmente o postraduccionalmente la transferencia de la proteína. El polipéptido puede ser también conjugado con un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poliHis) o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, se puede conjugar un polipéptido con una región inmunoglobulínica Fc.

Se pueden preparar polipéptidos utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas. Los polipéptidos recombinantes codificados por secuencias de DNA como las anteriormente descritas pueden ser fácilmente preparados a partir de las secuencias de DNA utilizando cualquiera de una diversidad de vectores de expresión conocidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. La expresión puede ser llevada a cabo

en cualquier célula huésped apropiada que haya sido transformada o transfectada con un vector de expresión que contiene una molécula de DNA que codifica un polipéptido recombinante. Las células huésped adecuadas incluyen procariontes, células de levadura, células eucarióticas superiores y células vegetales. Preferiblemente, las células huésped empleadas son *E. coli*, levadura o una línea celular de mamífero tal como COS o CHO. Los sobrenadantes de sistemas de huésped/vector adecuados que secretan la proteína o polipéptido recombinante al medio de cultivo pueden ser primero concentrados utilizando un filtro comercialmente asequible. Después de la concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación adecuada, tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Finalmente, se pueden emplear una o más operaciones de HPLC en fase inversa para purificar más un polipéptido recombinante.

También se pueden generar porciones y otras variantes que tengan menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, por medios sintéticos utilizando técnicas bien conocidas por quienes tienen una experiencia normal en este campo técnico. Por ejemplo, se pueden sintetizar dichos polipéptidos utilizando cualquiera de las técnicas en fase sólida comercialmente asequibles, tal como el método de Merrifield para síntesis en fase sólida, mediante el cual se añaden sucesivamente aminoácidos a una cadena de aminoácidos en crecimiento. Véase Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2156, 1963. El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos es comercialmente obtenible de proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, California), y puede ser hecho funcionar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En ciertas realizaciones específicas, un polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprenda múltiples polipéptidos como los aquí descritos, o que comprenda al menos un polipéptido como el aquí descrito y una secuencia no relacionada, tal como una proteína tumoral conocida. Una pareja de fusión puede ayudar, por ejemplo, a proporcionar epítopos T cooperadores (una pareja inmunológica de fusión), preferiblemente epítopos T cooperadores reconocidos por seres humanos, o puede ayudar a que se exprese la proteína (un potenciador de la expresión) con mayores rendimientos que los de la proteína recombinante nativa. Ciertas parejas de fusión preferidas son parejas de fusión tanto inmunológicas como potenciadoras de la expresión. Otras parejas de fusión pueden ser seleccionadas con objeto de aumentar la solubilidad de la proteína o de permitir que la proteína sea dirigida a compartimentos intracelulares deseados. Aún otras parejas de fusión incluyen etiquetas de afinidad, las cuales facilitan la purificación de la proteína.

Las proteínas de fusión pueden ser generalmente preparadas utilizando técnicas estándares, incluyendo la conjugación química. Preferiblemente, una proteína de fusión se expresa como una proteína recombinante, lo que permite la producción de niveles aumentados, con respecto a los de una proteína no fusionada, en un sistema de expresión. En pocas palabras, secuencias de DNA que codifican los componentes polipeptídicos pueden ser ensambladas separadamente y ser ligadas en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de DNA que codifica un componente polipeptídico es ligado, con o sin un conector peptídico, al extremo 5' de una secuencia de DNA que codifica el segundo componente polipeptídico para que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite la traducción en una sola proteína de fusión que conserva la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Se puede emplear una secuencia conectora peptídica para separar los componentes polipeptídicos primero y segundo por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria. Dicha secuencia conectora peptídica se incorpora a la proteína de fusión utilizando técnicas estándares bien conocidas en este campo técnico. Las secuencias conectoras peptídicas adecuadas se pueden elegir basándose en los factores siguientes: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interaccionar con epítopos funcionales de los polipéptidos primero y segundo; y (3) la carencia de restos hidrófobos o cargados que pudieran reaccionar con los epítopos polipeptídicos funcionales. Las secuencias conectoras peptídicas preferidas contienen restos de Gly, Asn y Ser. También se pueden utilizar otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, en la secuencia conectora. Las secuencias de aminoácidos que se pueden emplear útilmente como conectores incluyen las descritas en Maratea et al., *Gene* 40: 39-46, 1985; Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8258-8262, 1986; Patente de EE.UU. n° 4.935.233 y Patente de EE.UU. n° 4.751.180. La secuencia conectora puede tener generalmente una longitud de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. No se requieren secuencias conectoras cuando los polipéptidos primero y segundo tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que se pueden utilizar para separar los dominios funcionales y evitar una interferencia estérica.

Las secuencias de DNA ligadas están operativamente enlazadas con elementos reguladores de la transcripción o traducción adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión de DNA están situados sólo en 5' con respecto a la secuencia de DNA que codifica los polipéptidos primeros. Similarmente, los codones de parada requeridos para que finalice la traducción y las señales de terminación de la transcripción están sólo presentes en 3' con respecto a la secuencia de DNA que codifica el polipéptido segundo.

También se proporcionan proteínas de fusión que comprenden un polipéptido del presente invento junto con una proteína inmunogénica no relacionada. Preferiblemente, la proteína inmunogénica es capaz de provocar una

respuesta de memoria. Los ejemplos de dichas proteínas incluyen proteínas del tétanos, la tuberculosis y la hepatitis (véase, por ejemplo, Stoute et al., *New England J. Med.* 336: 86-91, 1997).

5 En realizaciones preferidas, una pareja de fusión inmunológica procede de la proteína D, una proteína superficial de la bacteria Gram negativa *Haemophilus influenza* B (WO 91/18926). Preferiblemente, un derivado de la proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales), y el derivado de la proteína D puede estar lipidado. En ciertas realizaciones preferidas, los primeros 109 restos de una pareja de fusión de lipoproteína D están incluidos en el extremo N para proporcionar epítopos exógenos adicionales de células T al polipéptido y aumentar el nivel de expresión en *E. coli* (actuando así como un potenciador de la expresión). La cola lipídica asegura la presentación óptima del antígeno a células presentadoras de antígeno. Otras parejas de fusión incluyen la proteína no estructural NS1 (hemaglutinina) de *influenzavirus*. Típicamente, se usan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque se pueden utilizar diferentes fragmentos que incluyan epítopos T cooperadores.

15 En otra realización, la pareja de fusión inmunológica es la proteína conocida como LYTA o una porción de la misma (preferiblemente, una porción C-terminal). LYTA procede de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; *Gene* 43: 265-292, 1986). LYTA es una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces de la cadena principal de peptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad por la colina o por ciertos compuestos análogos de colina, tal como el DEAE. Esta propiedad ha sido explotada para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de *E. coli*, útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento de C-LYTA en el extremo aminico (véase *Biotechnology* 10: 795-798, 1992). En una realización preferida, se puede incorporar una porción de repetición de LYTA a una proteína de fusión. Se encuentra una porción de repetición en la región C-terminal que comienza en el resto 178. Una porción de repetición particularmente preferida incorpora los restos 188-305.

20 En general, se aíslan polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) y polinucleótidos como los aquí descritos. Un polipéptido o polinucleótido "aislado" es uno que ha sido separado de su ambiente original. Por ejemplo, una proteína presente en la naturaleza está aislada si ha sido separada de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, dichos polipéptidos tienen una pureza de al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente una pureza de al menos aproximadamente 95% y muy preferiblemente una pureza de al menos aproximadamente 99%. Se considera que un polinucleótido está aislado si, por ejemplo, está clonado en un vector que no es parte del ambiente natural.

### 35 Agentes ligantes

El presente invento proporciona además agentes, tales como anticuerpos y fragmentos ligantes de antígeno de los mismos, que se unen específicamente a una proteína de tumor de mama. Como aquí se utiliza, se dice que un anticuerpo, o un fragmento ligante de antígenos del mismo, "se une específicamente" a una proteína de tumor de mama si reacciona con una proteína de tumor de mama en un nivel detectable (en, por ejemplo, un ELISA) y no reacciona detectablemente con proteínas no relacionadas bajo condiciones similares. Como aquí se utiliza, "unión" se refiere a una asociación no covalente entre dos moléculas separadas de tal modo que se forma un complejo. La capacidad para unirse puede ser evaluada, por ejemplo, determinando una constante de unión para la formación del complejo. La constante de unión es el valor obtenido cuando se divide la concentración del complejo por el producto de las concentraciones de los componentes. En general, en el contexto del presente invento, se dice que dos compuestos "se unen" cuando la constante de unión para la formación del complejo excede de aproximadamente  $10^3$  l/mol. La constante de unión puede ser determinada usando métodos bien conocidos en la técnica.

50 Los agentes ligantes pueden permitir además diferenciar entre pacientes con y sin un cáncer, tal como un cáncer de mama, al usar los ensayos representativos aquí proporcionados. En otras palabras, los anticuerpos u otros agentes ligantes que se unan a una proteína de tumor de mama generarán una señal que indica la presencia de un cáncer en al menos aproximadamente el 20% de los pacientes con la enfermedad y generarán una señal negativa que indica la ausencia de la enfermedad en al menos aproximadamente el 90% de los individuos sin el cáncer. Para determinar si un agente ligante satisface este requisito, se pueden examinar muestras biológicas (por ejemplo, sangre, sueros, orina y/o biopsias tumorales) de pacientes con y sin un cáncer (según se determina usando ensayos clínicos estándares), del modo aquí descrito, en cuanto a la presencia de polipéptidos que se unen al agente ligante. Es evidente que se debe examinar un número estadísticamente significativo de muestras con y sin la enfermedad. Cada agente ligante debería satisfacer los criterios anteriores; sin embargo, quienes tienen una experiencia normal en la técnica reconocerán que se pueden usar agentes ligantes en combinación para mejorar la sensibilidad.

60 Todo agente que satisfaga los requisitos anteriores puede ser un agente ligante. Por ejemplo, un agente ligante puede ser un ribosoma, con o sin un componente peptídico, una molécula de RNA o un polipéptido. En una realización preferida, un agente ligante es un anticuerpo o un fragmento ligante de antígenos del mismo. Los anticuerpos pueden ser preparados mediante cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por quienes tienen una experiencia normal en este campo técnico. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory*

*Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En general, los anticuerpos pueden ser producidos mediante técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales como aquí se describe, o por medio de la transfección de células huésped de bacteria o mamífero adecuadas con genes de anticuerpos, con objeto de permitir la producción de anticuerpos recombinantes. En una técnica, se inyecta inicialmente un agente inmunógeno que comprende el polipéptido en cualquiera de una gran diversidad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas o cabras). En esta operación, los polipéptidos de este invento pueden servir como agente inmunógeno sin modificación. Alternativamente, y particularmente para polipéptidos relativamente cortos, se puede provocar una respuesta inmune superior si se une el polipéptido a una proteína vehicular, tal como albúmina sérica bovina o hemocianina de lapa *Fissurella*. Se inyecta el agente inmunógeno al huésped animal, preferiblemente de acuerdo con un programa predeterminado que lleva incorporadas una o más inmunizaciones de refuerzo, y se sangran periódicamente los animales. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido pueden ser entonces purificados a partir de dichos antisueros mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el polipéptido conectado a un soporte sólido adecuado.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido antigénico de interés usando, por ejemplo, la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519, 1976, y mejoras de la misma. En pocas palabras, estos métodos acarrearán la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad (es decir, reactividad con el polipéptido de interés) deseada. Dichas líneas celulares se pueden producir, por ejemplo, a partir de células esplénicas obtenidas de un animal inmunizado del modo anteriormente descrito. Las células esplénicas son luego immortalizadas mediante, por ejemplo, fusión con una pareja de fusión de célula de mieloma, preferiblemente una que es singénica con respecto al animal inmunizado. Se puede emplear una diversidad de técnicas de fusión. Por ejemplo, se pueden combinar las células esplénicas y las células de mieloma con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y luego se puede sembrar la combinación, con baja densidad, en un medio selectivo que soporta el crecimiento de células híbridas pero no de células de mieloma. En una técnica de selección preferida se utiliza la selección por HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, normalmente de aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y se examinan los sobrenadantes de sus cultivos en cuanto a su actividad ligante frente al polipéptido. Se prefieren los hibridomas que tienen una reactividad y una especificidad elevadas.

Se pueden aislar anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de las colonias de hibridomas en crecimiento. Además, se pueden emplear diversas técnicas para aumentar el rendimiento, tal como la inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Luego se pueden recolectar anticuerpos monoclonales del fluido ascítico o la sangre. Los contaminantes pueden ser separados de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Los polipéptidos de este invento se pueden usar en el proceso de purificación, tal como, por ejemplo, en una operación de cromatografía de afinidad.

En ciertas realizaciones, se puede preferir el uso de fragmentos ligantes de antígeno de los anticuerpos. Dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab, que se pueden preparar usando técnicas estándares. En pocas palabras, se pueden purificar inmunoglobulinas a partir de suero de conejo mediante cromatografía de afinidad en columnas con glóbulos de proteína A (Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) y se pueden someter a digestión por papaína para obtener los fragmentos Fab y Fc. Los fragmentos Fab y Fc pueden ser separados por cromatografía de afinidad en columnas con glóbulos de proteína A.

Los anticuerpos monoclonales del presente invento pueden ser copulados con uno o más agentes terapéuticos. A este respecto, los agentes adecuados incluyen radionucleidos, agentes inductores de diferenciación, fármacos, toxinas, y derivados de los mismos. Los radionucleidos preferidos incluyen  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$  y  $^{212}\text{Bi}$ . Los fármacos preferidos incluyen metotrexato y compuestos análogos de pirimidina y purina. Los agentes inductores de diferenciación preferidos incluyen ácido butírico y ésteres de forbol. Las toxinas preferidas incluyen ricina, abrina, toxina diftérica, toxina colérica, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de *Shigella* y proteína antiviral de *Phytolacca americana*.

Se puede copular (por ejemplo, enlazar covalentemente) un agente terapéutico con un anticuerpo monoclonal adecuado, directa o indirectamente (por ejemplo, por medio de un grupo conector). Es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, de uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo lábil (por ejemplo, un haluro), del otro.

Alternativamente, puede ser deseable copular un agente terapéutico con un anticuerpo por medio de un grupo conector. Un grupo conector puede actuar como espaciador para alejar un anticuerpo de un agente con objeto de evitar interferencias en las capacidades ligantes. Un grupo conector también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente de un agente o de un anticuerpo y, de este modo, aumentar la eficacia de la copulación. Un aumento de reactividad química también puede facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales de

agentes, que, de lo contrario, no podrían ser usados.

Es evidente para los expertos en la técnica que, como grupo conector, se puede emplear una diversidad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homofuncionales como heterofuncionales (tales como los descritos en el catálogo de la Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, EE.UU.). La copulación se puede efectuar, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o restos de hidrato de carbono oxidados. Hay numerosas referencias en que se describe dicha metodología, tal como, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.671.958, concedida a Rodwell et al.

Cuando un agente terapéutico es más potente cuando está libre de la porción de anticuerpo de los productos de inmunconjugación del presente invento, puede ser deseable usar un grupo conector que sea escindible durante o después de la internalización en una célula. Se ha descrito un número de diferentes grupos conectores escindibles. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente desde estos grupos conectores incluyen la escisión por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.489.710, concedida a Spittler), por irradiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.625.014, concedida a Senter et al.), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácido derivatizadas (por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.638.045, concedida a Kohn et al.), por hidrólisis mediada por complemento sérico (por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.671.958, concedida a Rodwell et al.), y por hidrólisis catalizada por ácidos (por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.569.789, concedida a Blattler et al.).

Puede ser deseable copular más de un agente con un anticuerpo. En una realización, se copulan múltiples moléculas de un agente con una molécula de anticuerpo. En otra realización, se puede copular más de un tipo de agente con un anticuerpo. Al margen de la realización concreta, se pueden preparar productos de inmunconjugación con más de un agente de diversas maneras. Por ejemplo, se puede copular directamente más de un agente con una molécula de anticuerpo o se pueden usar conectores que proporcionen múltiples sitios para fijación. Alternativamente, se puede utilizar un vehículo.

Un vehículo puede llevar los agentes de diversas maneras, incluyendo el enlace covalente directamente o por medio de un grupo conector. Los vehículos adecuados incluyen proteínas tales como albúminas (por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.507.234, concedida a Kato et al.), péptidos y polisacáridos, tal como el aminodextrano (por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.699.784, concedida a Shih et al.). Un vehículo puede llevar también un agente por enlace no covalente o por encapsulación, tal como dentro de una vesícula liposómica (por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 4.429.008 y 4.873.088). Los vehículos específicos para agentes radionucleídicos incluyen compuestos quelantes y pequeñas moléculas radiohalogenadas. Por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 4.735.792 se describen pequeñas moléculas radiohalogenadas representativas y su síntesis. Se puede formar un quelato radionucleídico a partir de compuestos quelantes que incluyen aquellos que contienen átomos de nitrógeno y azufre como átomos dadores para unirse al radionucleido de metal u óxido metálico. En, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.673.562, concedida a Davison et al., se describen compuestos quelantes representativos y su síntesis.

Se puede utilizar una diversidad de vías de administración para los anticuerpos y productos de inmunconjugación. Típicamente, la administración será intravenosa, intramuscular, subcutánea o en el lecho de un tumor reseado. Es evidente que la dosis precisa del anticuerpo/producto de inmunconjugación variará dependiendo del anticuerpo usado, la densidad antigénica en el tumor y la velocidad de aclaramiento del anticuerpo.

#### Células t

Las composiciones inmunoterapéuticas pueden también, o alternativamente, comprender células T específicas para una proteína de tumor de mama. Dichas células pueden ser generalmente preparadas *in vitro* o *ex vivo* usando procedimientos estándares. Por ejemplo, se pueden aislar células T de médula ósea, sangre periférica, o una fracción de médula ósea o sangre periférica de un paciente, usando un sistema de separación celular comercialmente asequible, tal como el sistema ISOLEX™, asequible de Nexell Therapeutics Inc., Irvine, California (véanse también la Patente de EE.UU. nº 5.240.856, la Patente de EE.UU. nº 5.215.926 y los Documentos WO 89/06280, WO 91/16116 y WO 92/07243). Alternativamente, se pueden obtener células T de seres humanos relacionados o no relacionados, mamíferos no humanos, líneas celulares o cultivos.

Las células T pueden ser estimuladas con un polipéptido de tumor de mama, un polinucleótido que codifica un polipéptido de tumor de mama, y/o una célula presentadora de antígeno (APC) que expresa dicho polipéptido. Dicha estimulación es llevada a cabo bajo unas condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la generación de células T que sean específicas para el polipéptido. Preferiblemente, un polinucleótido o polipéptido de tumor de mama está presente dentro de un vehículo de distribución, tal como una microesfera, para facilitar la generación de células T específicas.

Se considera que las células T son específicas para un polipéptido de tumor de mama si las células T matan células diana revestidas con el polipéptido o que expresan un gen que codifica el polipéptido. La especificidad de las células T puede ser evaluada utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas estándares. Por ejemplo, en un ensayo de

liberación de cromo o un ensayo de proliferación, un índice de estimulación superior a un aumento de dos órdenes de magnitud en la lisis y/o la proliferación, en comparación con testigos negativos, indica especificidad de células T. Dichos ensayos pueden ser llevados a cabo, por ejemplo, del modo descrito por Chen et al., *Cancer Res.* 54: 1065-1070, 1994. Alternativamente, se puede llevar a cabo la detección de la proliferación de células T mediante una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede detectar proliferación de células T al medir una velocidad aumentada de síntesis de DNA (por ejemplo, mediante la marcación de cultivos de células T con pulsos de timidina tritiada y medición de la cantidad de timidina tritiada incorporada al DNA). El contacto con un polipéptido de tumor de mama (100 ng/ml – 100 µg/ml, preferiblemente 200 ng/ml – 25 µg/ml) durante 3 – 7 días debería dar lugar a un aumento de proliferación de las células T de al menos dos órdenes de magnitud. Un contacto como el anteriormente descrito durante 2-3 horas debería dar lugar a la activación de las células T, según se mide usando ensayos estándares de citocinas en que un aumento del nivel de liberación de citocinas (por ejemplo, TNF o IFN-γ) de dos órdenes de magnitud es indicativo de activación de células T [véase Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, volumen 1, Wiley Interscience (Greene, 1998)]. Las células T que han resultado activadas en respuesta a un polipéptido o polinucleótido de tumor de mama o a APCs que expresan el polipéptido pueden ser CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>. Las células T específicas de proteína de tumor de mama pueden ser multiplicadas usando técnicas estándares. En realizaciones preferidas, las células T proceden de un paciente o de un donante relacionado o no relacionado y son administradas al paciente después de la estimulación y la multiplicación.

Para fines terapéuticos, el número de células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que proliferan en respuesta a un polipéptido, polinucleótido o APC de tumor de mama puede ser aumentado *in vitro* o *in vivo*. La proliferación de dichas células T *in vitro* puede ser llevada a cabo de diversas maneras. Por ejemplo, las células T pueden ser expuestas de nuevo a un polipéptido de tumor de mama, o a un péptido corto que corresponda a una porción inmunogénica de dicho polipéptido, con o sin la adición de factores de crecimiento de células T, tal como la interleucina 2, y/o a células estimuladoras que sintetizan un polipéptido de tumor de mama. Alternativamente, el número de una o más células T que proliferan en presencia de una proteína de tumor de mama puede ser aumentado por clonación. Los métodos para clonar células son bien conocidos en la técnica e incluyen la clonación por dilución limitante.

#### Composiciones farmacéuticas y vacunas

En ciertos aspectos, los polipéptidos, polinucleótidos, células T y/o agentes ligantes aquí descritos pueden ser incorporados a composiciones farmacéuticas o composiciones inmunogénicas (es decir, vacunas). Las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más de dichos compuestos y un vehículo fisiológicamente aceptable. Las vacunas pueden comprender uno o más de dichos compuestos y un agente inmunoestimulante. Un agente inmunoestimulante puede ser cualquier sustancia que potencie una respuesta inmune hacia un antígeno exógeno. Los ejemplos de agentes inmunoestimulantes incluyen adyuvantes, microesferas biodegradables [por ejemplo, poli(galactida láctica)] y liposomas (a los que se incorpora el compuesto; véase, por ejemplo, Fullerton, Patente de EE.UU. nº 4.235.877). En general, la preparación de vacunas se describe en, por ejemplo, M. F. Powell y M. J. Newman (redactores), "Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)", Plenum Press (New York, 1995). Las composiciones farmacéuticas y vacunas dentro del alcance del presente invento pueden contener también otros compuestos, los cuales pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, en la composición o la vacuna puede estar presente una o más porciones inmunogénicas de otros antígenos tumorales, ya sea incorporada a un polipéptido de fusión o ya sea como un compuesto separado.

Una composición farmacéutica o vacuna puede contener DNA que codifique uno o más de los polipéptidos anteriormente descritos para que el polipéptido se genere *in situ*. Como se indicó anteriormente, el DNA puede estar presente dentro de cualquiera de una diversidad de sistemas de distribución conocidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, bacterias y sistemas de expresión víricos. Numerosas técnicas de distribución génica son bien conocidas en la técnica, tales como las descritas por Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15: 143-198, 1998, y las referencias allí citadas. Los sistemas de expresión de ácido nucleico apropiados contienen las necesarias secuencias de DNA para expresión en el paciente (tal como un promotor y una señal de terminación adecuados). Los sistemas de distribución bacterianos implican la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que expresa una porción inmunogénica del polipéptido en su superficie celular o secreta dicho epítipo. En una realización preferida, se puede introducir el DNA utilizando un sistema de expresión vírico (por ejemplo, un virus vaccinia u otro poxvirus, un retrovirus o un adenovirus), lo que puede implicar el uso de un virus no patógeno (defectuoso), competente en cuanto a la replicación. Se describen sistemas adecuados en, por ejemplo, Fisher-Hoch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 317-321, 1989; Flexner et al., *Ann. NY. Acad. Sci.* 569: 86-103, 1989; Flexner et al., *Vaccine* 8: 17-21, 1990; Patentes de EE.UU. números 4.603.112, 4.769.330 y 5.017.487; Documento WO 89/01973; Patente de EE.UU. nº 4.777.127; Documentos GB 2.200.651, EP 0.345.242 y WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6: 616-627, 1988; Rosenfeld et al., *Science* 252: 431-434, 1991; Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 215-219, 1994; Kass-Eisler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11.498-11.502, 1993; Guzman et al., *Circulation* 88: 2838-2848, 1993; y Guzman et al., *Cir. Res.* 73: 1202-1207, 1993. Las técnicas para incorporar DNA a dichos sistemas de expresión son bien conocidas por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. El DNA puede ser también "desnudo", como se describe en, por ejemplo, Ulmer et al., *Science* 259: 1745-1749, 1993, y revisa Cohen, *Science* 259: 1691-1692, 1993. La incorporación de DNA desnudo puede ser aumentada al revestir glóbulos biodegradables con el DNA,

glóbulos que son eficazmente transportados a las células.

Aunque en las composiciones farmacéuticas se puede emplear cualquier vehículo adecuado conocido por quienes tienen una experiencia normal en la técnica, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Las composiciones pueden ser formuladas para cualquier modo apropiado de administración, incluyendo, por ejemplo, las administraciones tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular. Para administración parenteral, tal como una inyección subcutánea, el vehículo comprende preferiblemente agua, disolución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, se puede emplear cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido tal como manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa o carbonato magnésico. También se pueden emplear microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato-poliglicolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de este invento. En, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 4.897.268 y 5.075.109 se describen microesferas biodegradables adecuadas.

Dichas composiciones pueden comprender también tampones (por ejemplo, disolución salina tamponada neutra y disolución salina tamponada con fosfato), hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa y dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicocola, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA y glutatión, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y/o conservantes. Alternativamente, las composiciones del presente invento pueden ser formuladas como un producto liofilizado. Los compuestos pueden ser también encapsulados en liposomas usando una tecnología bien conocida.

En las vacunas de este invento se puede emplear cualquiera de una diversidad de agentes inmunoestimulantes. Por ejemplo, se puede incluir un adyuvante. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia destinada a proteger al antígeno de un rápido metabolismo, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un agente estimulador de respuestas inmunes, tal como lípido A o proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Los adyuvantes adecuados son comercialmente asequibles como, por ejemplo, los adyuvantes completo e incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.); adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, New Jersey, EE.UU.); sales de aluminio tales como fosfato de aluminio y gel de hidróxido de aluminio (alúmina); sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión de tirosina acilada insoluble; azucares acilados; polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil-lípido A y Quil A. También se pueden usar citocinas, tales como GM-CSF e interleucina 2, 7 ó 12, como adyuvantes.

En las vacunas aquí proporcionadas, la composición adyuvante es preferiblemente diseñada para que provoque predominantemente una respuesta inmune del tipo Th1. Niveles elevados de citocinas de tipo Th1 (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células hacia un antígeno administrado. Por contraste, niveles elevados de citocinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. Después de la aplicación de una vacuna como la aquí proporcionada, el paciente sostendrá una respuesta inmune que incluirá respuestas de tipos Th1 y Th2. En una realización preferida en que una respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará en mayor medida que el nivel de citocinas de tipo Th2. Los niveles de estas citocinas pueden ser fácilmente evaluados usando ensayos estándares. Para una revisión de las familias de citocinas, véase Mosmann y Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-173, 1989.

Los adyuvantes preferidos para uso en la provocación de una respuesta de tipo predominantemente Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil-lípido A (MPL; del inglés, monophosphoryl lipid A), preferiblemente monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), junto con una sal de aluminio. Los adyuvantes de MPL son asequibles de Ribi ImmunoChem Research Inc. (Hamilton, Montana, EE.UU.) (véanse las Patentes de EE.UU. números 4.436.727, 4.877.611, 4.866.034 y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en que el dinucleótido CpG está sin metilar) también provocan una respuesta predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y son descritos en, por ejemplo, el Documento WO 96/02555. Otro adyuvante preferido es una saponina, preferiblemente Qs21, que puede ser usada sola o en combinación con otros adyuvantes. Por ejemplo, un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil-lípido A y un derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL, como se describe en el Documento WO 94/00153, o una composición menos reactiva en que QS21 está sofocado con colesterol, como se describe en el Documento WO 96/33739. Otras formulaciones preferidas comprenden tocoferol y una emulsión de aceite en agua. En el Documento WO 95/17210 se describe una formulación adyuvante particularmente potente que incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua. Se puede preparar cualquier vacuna aquí proporcionada usando métodos bien conocidos que den lugar a una combinación de un antígeno, un potenciador de la respuesta inmune y un vehículo o excipiente adecuado.

Las composiciones aquí descritas pueden ser administradas como parte de una formulación de liberación continua [es decir, una formulación tal como una cápsula, esponja o gel (compuesta de, por ejemplo, polisacáridos) que efectúe una liberación lenta del compuesto después de la administración]. En general, dichas formulaciones se pueden preparar usando una tecnología bien conocida y se pueden administrar mediante, por ejemplo, implantación oral, rectal o subcutánea o mediante implantación en el sitio diana deseado. Las formulaciones de liberación

continua pueden contener un polipéptido, polinucleótido o anticuerpo disperso en una matriz vehicular y/o contenido en un depósito rodeado por una membrana que controla la velocidad de liberación. Los vehículos para uso en dichas formulaciones son biocompatibles y pueden ser también biodegradables; preferiblemente, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del componente activo. La cantidad de compuesto activo contenido en una formulación de liberación continua depende del lugar de implantación, la velocidad y la duración esperada de liberación, y la naturaleza del estado que se va a tratar o prevenir.

En las composiciones farmacéuticas y vacunas se puede emplear cualquiera de una diversidad de vehículos de distribución para facilitar la producción de una respuesta inmune antigénicamente específica que se dirija a células tumorales. Los vehículos de distribución incluyen células presentadoras de antígeno (APCs), tales como células dendríticas, macrófagos, células B, monocitos y otras células que se pueden diseñar para que sean APCs eficaces. Dichas células pueden ser genéticamente modificadas, aunque no es necesario, para aumentar la capacidad para presentar el antígeno, para mejorar la activación y/o el mantenimiento de la respuesta de células T, para que tengan *per se* efectos antitumorales y/o para que sean inmunológicamente compatibles con el receptor (es decir, haplotipo de HLA coincidente). Las APCs pueden ser generalmente aisladas a partir de cualquiera de una diversidad de órganos y fluidos biológicos, incluyendo tejidos tumorales y peritumorales, y pueden ser autólogas, alogénicas, singénicas o xenogénicas.

En ciertas realizaciones preferidas del presente invento se usan células dendríticas o progenitores de las mismas como células presentadoras de antígeno. Las células dendríticas son APCs muy potentes (Banchereau y Steinman, *Nature* 392: 245-251, 1998) y se ha mostrado que son eficaces como adyuvantes fisiológicos para provocar una inmunidad antitumoral profiláctica o terapéutica (véase Timmerman y Levy, *Ann. Rev. Med.* 50: 507-529, 1999). En general, las células dendríticas pueden ser identificadas basándose en su forma típica [estrellada *in situ*, con acusadas proyecciones citoplásmicas (dendritas) visibles *in vitro*], su capacidad para incorporar, procesar y presentar antígenos con elevada eficacia, y su capacidad para activar respuestas de células T naïf. Por supuesto, las células dendríticas pueden ser genéticamente modificadas para que expresen ligandos o receptores de superficie celular específicos que no se encuentran habitualmente en células dendríticas *in vivo* ni *ex vivo*, y dichas células dendríticas modificadas son contempladas por el presente invento. Como una alternativa a las células dendríticas, se pueden usar células dendríticas cargadas de antígeno de vesículas secretadas (llamadas exosomas) en una vacuna (véase Zitvogel et al., *Nature Med.* 4: 594-600, 1998).

Las células dendríticas y los progenitores pueden obtenerse de sangre periférica, médula ósea, células que se infiltran en tumores, células que se infiltran en tejidos peritumorales, ganglios linfáticos, bazo, piel, sangre de cordón umbilical o cualquier otro tejido o fluido adecuado. Por ejemplo, las células dendríticas se pueden diferenciar *ex vivo* al añadir una combinación de citocinas tales como GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o TNF- $\alpha$  a cultivos de monocitos recolectados de sangre periférica. Alternativamente, células CD34 positivas recolectadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea se pueden diferenciar en células dendríticas al añadir al medio de cultivo combinaciones de GM-CSF, IL-3, TNF- $\alpha$ , ligando de CD40, LPS, ligando de flt3 y/u otro(s) compuesto(s) que provoquen la diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas.

Las células dendríticas son convenientemente categorizadas como células "inmaduras" y "maduras", lo que permite una manera sencilla de discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, no se debería interpretar que esta nomenclatura excluye todas las posibles fases intermedias de diferenciación. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como APCs con una elevada capacidad para la incorporación y el procesamiento de antígenos, lo que se correlaciona con la elevada expresión del receptor de Fc $\gamma$  y el receptor de manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una menor expresión de estos marcadores pero una elevada expresión de moléculas de la superficie celular responsables de la activación de células T, tales como MHC de clase I y clase II, moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11) y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1BB).

Las APCs pueden ser generalmente transfectadas con un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama (o una porción u otra variante de la misma) para que el polipéptido de tumor de mama, o una porción inmunogénica del mismo, se exprese en la superficie celular. Dicha transfección puede tener lugar *ex vivo*, y luego se puede usar una composición o vacuna que comprenda dichas células transfectadas con fines terapéuticos, como aquí se describe. Alternativamente, se puede administrar a un paciente un vehículo de distribución génica que se dirija a una célula dendrítica u otra célula presentadora de antígeno, lo que origina que la transfección se produzca *in vivo*. La transfección *in vivo* y *ex vivo* de células dendríticas puede ser llevada generalmente a cabo, por ejemplo, usando cualesquier métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en el Documento WO 97/24447, o el procedimiento de la pistola génica descrito por Mahvi et al., *Immunology and Cell Biology* 75: 456-460, 1997. La carga antigénica de las células dendríticas puede ser llevada a cabo incubando células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido, DNA (desnudo o dentro de un vector plasmídico) o RNA de tumor de mama, o con bacterias o virus recombinantes que expresan el antígeno (por ejemplo, vectores de virus vaccinia, virus de la viruela aviar, adenovirus o lentivirus). Antes de la carga, el polipéptido puede ser covalentemente conjugado con una pareja inmunológica que proporcione la cooperación de células T (por ejemplo, una molécula vehicular). Alternativamente, se puede impulsar una célula dendrítica con una pareja inmunológica no conjugada, separadamente o en presencia

del polipéptido.

Terapia del cáncer

5 En otros aspectos, las composiciones aquí descritas pueden ser utilizadas para la inmunoterapia del cáncer, tal como el cáncer de mama. En dichos métodos, se administran típicamente composiciones farmacéuticas y vacunas a un paciente. Como aquí se usa, un "paciente" se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente un ser humano. El paciente puede estar aquejado de cáncer o no. En consecuencia, las anteriores composiciones farmacéuticas y vacunas pueden ser utilizadas para prevenir el desarrollo de un cáncer o para tratar a un paciente

10 aquejado de un cáncer. Se puede diagnosticar un cáncer usando criterios generalmente aceptados en la técnica, incluyendo la presencia de un tumor maligno. Las composiciones farmacéuticas y vacunas se pueden administrar antes o después de la extirpación quirúrgica de tumores primarios y/o de un tratamiento tal como la administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales.

15 En ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede ser una inmunoterapia activa, en la que el tratamiento se basa en la estimulación *in vivo* del sistema inmune endógeno del huésped para que reaccione contra tumores con la administración de agentes modificadores de la respuesta inmune (tales como los polipéptidos y polinucleótidos aquí descritos).

20 En otras realizaciones, la inmunoterapia puede ser una inmunoterapia pasiva, en la que el tratamiento implica la distribución de agentes con una establecida reactividad inmune sobre tumores (tales como células efectoras o anticuerpos) que puede transmitir directa o indirectamente efectos antitumorales y no depende necesariamente de un sistema inmune intacto del huésped. Los ejemplos de células efectoras incluyen células T como las anteriormente discutidas, linfocitos T (tales como linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, y linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> que se infiltran en tumores), células asesinas (tales como células asesinas naturales y células asesinas activadas por linfocinas),

25 células B y células presentadoras de antígeno (tales como células dendríticas y macrófagos) que expresan un polipéptido aquí proporcionado. Los receptores de células T y receptores de anticuerpo específicos para los polipéptidos aquí citados pueden ser clonados, expresados y transferidos a otros vectores o células efectoras para una inmunoterapia adoptiva. Los polipéptidos aquí proporcionados pueden ser también utilizados para generar anticuerpos o anticuerpos antiidiotípicos (como se describió anteriormente y en la Patente de EE.UU. n° 4.918.164) para una inmunoterapia pasiva.

30

Mediante crecimiento *in vitro*, como aquí se describe, se pueden obtener generalmente células efectoras en cantidades suficientes para una inmunoterapia adoptiva. Las condiciones de cultivo para multiplicar células efectoras individuales antigénicamente específicas hasta un número de varios miles de millones con conservación del reconocimiento antigénico *in vivo* son bien conocidas en la técnica. Dichas condiciones de cultivo *in vitro* implican típicamente la estimulación intermitente con antígeno, a menudo en presencia de citocinas (tales como IL-2) y células nutrientes ("feeder") que no se dividen. Como se indicó anteriormente, se pueden usar polipéptidos inmunorreactivos como los aquí proporcionados para multiplicar rápidamente cultivos de células T antigénicamente

35 específicas con objeto de generar un número suficiente de células para inmunoterapia. En particular, células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, macrófagos, monocitos, fibroblastos y células B, pueden ser estimuladas con polipéptidos inmunorreactivos o ser transfectadas con uno o más polinucleótidos usando técnicas estándares bien conocidas en este campo técnico. Por ejemplo, se pueden transfectar células presentadoras de antígeno con un polinucleótido que tenga un promotor apropiado para aumentar la expresión en un virus recombinante u otro sistema de expresión. Las células efectoras cultivadas para uso en terapia deben ser capaces de crecer y distribuirse ampliamente y de sobrevivir mucho tiempo *in vivo*. Ciertos estudios han mostrado que se puede inducir el crecimiento *in vivo* y la supervivencia de larga duración en números sustanciales de las células efectoras cultivadas, mediante la estimulación repetida con antígeno complementado con IL-2 (véase, por ejemplo, Cheever et al., *Immunological Reviews* 157; 177, 1997).

40

45

50

Alternativamente, un vector que expresa un polipéptido aquí citado puede ser introducido en células presentadoras de antígeno obtenidas de un paciente y clonalmente propagadas *ex vivo* para su trasplante de vuelta en el mismo paciente. Las células transfectadas pueden ser reintroducidas en el paciente usando cualquier medio conocido en la técnica, preferiblemente en forma estéril mediante administración intravenosa, intracavitaria, intraperitoneal o intratumoral.

55

Las vías y la frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas aquí descritas, así como la dosificación, variarán de individuo a individuo y podrán ser fácilmente establecidas usando técnicas estándares. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden ser administradas por inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasalmente (por ejemplo, por aspiración) u oralmente. Preferiblemente se pueden administrar entre 1 y 10 dosis a lo largo de un periodo de 52 semanas. Preferiblemente, se administran 6 dosis a intervalos de 1 mes, y más tarde se pueden administrar periódicamente vacunaciones de refuerzo. Protocolos alternativos pueden ser apropiados para pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de un compuesto que, cuando se administra del modo anteriormente descrito, es capaz de provocar una

60

65 respuesta inmune antitumoral, que está al menos 10-50% por encima del nivel basal (es decir, sin tratamiento).

Dicha respuesta puede ser verificada midiendo los anticuerpos antitumorales en el paciente o por la generación, dependiente de vacuna, de células efectoras citolíticas capaces de matar las células tumorales del paciente *in vitro*. Dichas vacunas también deberían ser capaces de causar una respuesta inmune que condujera a un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes o una supervivencia completa o parcial o más duradera sin enfermedad) en los pacientes vacunados en comparación con los pacientes no vacunados. En general, para las composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden uno o más polipéptidos, la cantidad de cada polipéptido presente en una dosis varía de aproximadamente 100 µg a 5 mg por kg de huésped. Los tamaños adecuados de las dosis variarán con el tamaño del paciente, pero se extenderán típicamente de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml.

En general, un régimen de dosificación y tratamiento apropiado proporciona el(los) compuesto(s) activo(s) en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Dicha respuesta puede ser verificada estableciendo un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes o una supervivencia completa o parcial o más duradera sin enfermedad) en los pacientes tratados en comparación con los pacientes no tratados. Los aumentos de respuestas inmunes preexistentes hacia una proteína de tumor de mama se correlacionan generalmente con un resultado clínico mejorado. Dichas respuestas inmunes pueden ser generalmente evaluadas usando ensayos estándares de proliferación, citotoxicidad o citocinas, los cuales pueden ser llevados a cabo usando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

#### Métodos para detectar el cáncer

En general, se puede detectar un cáncer en un paciente basándose en la presencia de una o más proteínas de tumor de mama y/o polinucleótidos que codifican dichas proteínas en una muestra biológica (por ejemplo, sangre, sueros, orina y/o biopsias tumorales) obtenida del paciente. En otras palabras, dichas proteínas se pueden utilizar como marcadores para indicar la presencia o ausencia de un cáncer tal como un cáncer de mama. Además, dichas proteínas pueden ser útiles para la detección de otros cánceres. Los agentes ligantes aquí proporcionados permiten generalmente la detección del nivel de antígeno que se une al agente en la muestra biológica. Se pueden usar cebadores y sondas polinucleotídicos para detectar el nivel de mRNA que codifica una proteína tumoral, lo que es también indicativo de la presencia o ausencia de un cáncer. En general, debería estar presente una secuencia de tumor de mama en un nivel que fuera al menos tres veces mayor en el tejido tumoral que en el tejido normal.

Hay una diversidad de formatos de ensayo conocidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica en los que se usa un agente ligante para detectar marcadores polipeptídicos en una muestra. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En general, la presencia o ausencia de un cáncer en un paciente puede ser determinada (a) poniendo una muestra biológica obtenida del paciente en contacto con un agente ligante; (b) detectando en la muestra un nivel de polipéptido que se une al agente ligante; y (c) comparando el nivel de polipéptido con un valor de corte predeterminado.

En una realización preferida, el ensayo implica el uso de un agente ligante inmovilizado en un soporte sólido para que se una al polipéptido y lo separe del resto de la muestra. El polipéptido unido puede ser luego detectado usando un reactivo de detección que contiene un grupo informador y se une específicamente al complejo de agente ligante/polipéptido. Dichos reactivos de detección pueden comprender, por ejemplo, un agente ligante que se une específicamente al polipéptido, o un anticuerpo u otro agente que se une específicamente al agente ligante tal como una antiinmunoglobulina, proteína G, proteína A o una lectina. Alternativamente, se puede utilizar un ensayo competitivo en el que un polipéptido es etiquetado con un grupo informador y es dejado que se una al agente ligante inmovilizado después de la incubación del agente ligante con la muestra. El grado en que los componentes de la muestra inhiben la unión del agente ligante con el polipéptido etiquetado es indicativo de la reactividad de la muestra con el agente ligante inmovilizado. Los polipéptidos adecuados para uso en dichos ensayos incluyen proteínas de tumor de mama de longitud completa y porciones de las mismas a las que se une el agente ligante, como se describió anteriormente.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por quienes tienen una experiencia normal en la técnica, al que se puede fijar la proteína tumoral. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pocillo de ensayo de una placa de microtitulación, o una membrana de celulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser un glóbulo o un disco, tal como de vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o poli(cloruro de vinilo). El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tales como los descritos en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 5.359.681. El agente ligante puede ser inmovilizado en el soporte sólido usando una diversidad de técnicas conocidas por quienes tienen experiencia en este campo técnico, las cuales son ampliamente descritas en la bibliografía científica y de patentes. En el contexto del presente invento, el término "inmovilización" se refiere tanto a la asociación no covalente, tal como la adsorción, como a la fijación covalente (que puede ser un enlace directo entre el agente y grupos funcionales del soporte o puede ser un enlace por medio de un agente entrecruzante). Se prefiere la inmovilización por adsorción a un pocillo de una placa de microtitulación o a una membrana. En tales casos, se puede conseguir la adsorción al poner el agente ligante, en un tampón adecuado, en contacto con el soporte sólido durante un periodo adecuado de tiempo. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero es típicamente de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día. En general, la puesta

en contacto de un pocillo de una placa de microtitulación de plástico [tal como de poliestireno o poli(cloruro de vinilo)] con una cantidad de agente ligante que varía de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 10 µg, y preferiblemente de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 µg, es suficiente para inmovilizar una cantidad adecuada de agente ligante.

La fijación covalente del agente ligante a un soporte sólido puede ser llevada generalmente a cabo haciendo reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con un grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, del agente ligante. Por ejemplo, el agente ligante puede ser covalentemente fijado a soportes que tienen un revestimiento apropiado de polímero usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído del soporte con una amina y un hidrógeno activo de la pareja ligante (véase, por ejemplo, *Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook*, 1991, en A12-A13).

En ciertas realizaciones, el ensayo es un ensayo de tipo sándwich con dos anticuerpos. Este ensayo puede ser llevado a cabo poniendo primero un anticuerpo que ha sido inmovilizado en un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microtitulación, en contacto con la muestra para permitir que los polipéptidos de la muestra se unan al anticuerpo inmovilizado. Luego se separa la muestra no unida de los complejos de polipéptido-anticuerpo inmovilizados y se añade un reactivo de detección (preferiblemente un segundo anticuerpo capaz de unirse a un sitio diferente del polipéptido) que contiene un grupo informador. Luego se determina la cantidad de reactivo de detección que permanece unido al soporte sólido usando un método apropiado para el grupo informador específico.

Más específicamente, una vez que se ha inmovilizado el anticuerpo en el soporte del modo anteriormente descrito, se bloquean típicamente los sitios ligantes de proteína restantes del soporte. Se puede usar cualquier agente bloqueante adecuado conocido por quienes tienen una experiencia normal en la técnica, tal como albúmina sérica bovina o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.). Luego se incubaba la muestra con el anticuerpo inmovilizado y se deja que el polipéptido se una al anticuerpo. La muestra puede ser diluida con un agente diluyente adecuado, tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline), antes de la incubación. En general, un tiempo de contacto apropiado (es decir, el tiempo de incubación) es un periodo de tiempo que es suficiente para detectar la presencia de un polipéptido en una muestra obtenida de un individuo con cáncer de mama. Preferiblemente, el tiempo de contacto es suficiente para alcanzar un nivel de unión que es al menos aproximadamente el 95% del alcanzado en el equilibrio entre el polipéptido unido y el no unido. Quienes tienen una experiencia normal en la técnica reconocerán que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio puede ser fácilmente determinado examinando el nivel de unión que tiene lugar a lo largo de un periodo de tiempo. A temperatura ambiental, basta generalmente un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos.

La muestra no unida puede ser luego separada lavando el soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS que contiene Tween 20™ al 0,1%. Luego se puede añadir el segundo anticuerpo, que contiene un grupo informador, al soporte sólido. Los grupos informadores preferidos incluyen los grupos anteriormente citados.

El reactivo de detección es luego incubado con el complejo de anticuerpo inmovilizado-polipéptido durante un espacio de tiempo suficiente para detectar el polipéptido unido. En general, se puede determinar un espacio de tiempo apropiado examinando el nivel de unión que tiene lugar a lo largo de un periodo de tiempo. Luego se separa el reactivo de detección no unido y se detecta el reactivo de detección unido usando el grupo informador. El método empleado para detectar el grupo informador depende de la naturaleza del grupo informador. Para grupos radiactivos, los métodos autorradiográficos o de recuento de centelleo son generalmente apropiados. Se pueden usar métodos espectroscópicos para detectar colorantes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. Se puede detectar biotina usando avidina copulada con un grupo informador diferente (comúnmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos informadores enzimáticos pueden ser generalmente detectados mediante la adición de un sustrato (generalmente durante un periodo específico de tiempo), seguida del análisis espectroscópico u otro análisis de los productos de reacción.

Para determinar la presencia o ausencia de un cáncer, tal como un cáncer de mama, la señal detectada procedente del grupo informador que permanece unido al soporte sólido es generalmente comparada con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. En una realización preferida, el valor de corte para la detección de un cáncer es la señal media obtenida cuando el anticuerpo inmovilizado es incubado con muestras de pacientes sin el cáncer. En general, se considera que una muestra que genere una señal que esté tres desviaciones estándares por encima del valor de corte predeterminado es positiva para el cáncer. En una realización alternativa preferida, el valor de corte es determinado utilizando una Curva Operativa del Receptor, de acuerdo con el método de Sackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, páginas 106-7. En pocas palabras, en esta realización, se puede determinar el valor de corte a partir de un gráfico de pares de índices de verdaderos positivos (es decir, sensibilidad) e índices de falsos positivos (100%-especificidad) que corresponden a cada posible valor de corte para el resultado del ensayo diagnóstico. El valor de corte del gráfico que sea el más próximo a la esquina superior izquierda (es decir, el valor que encierra la mayor superficie) es el valor de corte más preciso, y se puede considerar que una muestra que genere una señal que sea superior al valor de corte determinado mediante este método es positiva. Alternativamente, el valor de corte puede ser desplazado a la izquierda a lo largo del gráfico para minimizar el índice de falsos positivos, o a la derecha para minimizar el índice de

falsos negativos. En general, se considera que una muestra que genere una señal que sea superior al valor de corte determinado mediante este método es positiva para un cáncer.

En una realización relacionada, el ensayo se lleva a cabo en un formato de ensayo en tira o de flujo a través, en el que el agente ligante está inmovilizado en una membrana, tal como una de nitrocelulosa. En el ensayo de flujo a través, los polipéptidos de la muestra se unen al agente ligante inmovilizado conforme la muestra atraviesa la membrana. Luego se une un segundo agente ligante etiquetado al complejo de agente ligante-polipéptido conforme una disolución que contiene el segundo agente ligante atraviesa la membrana. Luego se puede llevar a cabo la detección del segundo agente ligante unido, del modo anteriormente descrito. En el formato de ensayo en tira, se sumerge un extremo de la membrana a la cual está unido el agente ligante, en una disolución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene el segundo agente ligante y a la zona del agente ligante inmovilizado. La concentración del segundo agente ligante en la zona del anticuerpo inmovilizado indica la presencia de un cáncer. Típicamente la concentración del segundo agente ligante en ese sitio genera un dibujo, tal como una línea, que se puede leer visualmente. La ausencia de dicho dibujo indica un resultado negativo. En general, la cantidad de agente ligante inmovilizado en la membrana es seleccionada para que se genere un dibujo visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel de polipéptido que bastaría para generar una señal positiva en el ensayo de tipo sándwich con dos anticuerpos, en el formato anteriormente discutido. Los agentes ligantes preferidos para uso en dichos ensayos son anticuerpos y fragmentos ligantes de antígeno de los mismos. Preferiblemente, la cantidad de anticuerpo inmovilizado en la membrana varía de aproximadamente 25 ng a aproximadamente 1 µg, y más preferiblemente de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng. Dichos ensayos pueden ser llevados típicamente a cabo con una pequeñísima cantidad de muestra biológica.

Por supuesto, existen otros numerosos protocolos de ensayo que son adecuados para uso con las proteínas tumorales o agentes ligantes del presente invento. Se pretende que las anteriores descripciones sólo sean ejemplares. Por ejemplo, resultará evidente a quienes tienen una experiencia normal en la técnica que los protocolos anteriores pueden ser fácilmente modificados para usar polipéptidos de tumor de mama para detectar anticuerpos que se unen a dichos polipéptidos en una muestra biológica. La detección de dichos anticuerpos específicos para proteínas de tumor de mama se puede correlacionar con la presencia de un cáncer.

Un cáncer puede ser también o alternativamente detectado basándose en la presencia de células T que reaccionan específicamente con una proteína de tumor de mama en una muestra biológica. En ciertos métodos, una muestra biológica que comprende células T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> aisladas de un paciente es incubada con un polipéptido de tumor de mama, un polinucleótido que codifica dicho polipéptido, y/o una APC que expresa al menos una porción inmunogénica de dicho polipéptido, y se detecta la presencia o ausencia de una activación específica de las células T. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células T aisladas. Por ejemplo, se pueden aislar células T de un paciente mediante técnicas rutinarias (tal como por centrifugación de linfocitos de sangre periférica en un gradiente de densidades de Ficoll/Hypaque). Las células T pueden ser incubadas *in vitro* con el polipéptido (por ejemplo, 5 – 25 µg/ml) durante 2-9 días (típicamente 4 días) a 37 °C. Puede resultar deseable incubar otra parte alícuota de una muestra de células T en ausencia del polipéptido de tumor de mama, para que sirva como testigo. Para células T CD4<sup>+</sup>, la activación es preferiblemente detectada evaluando la proliferación de las células T. Para células T CD8<sup>+</sup>, la activación es preferiblemente detectada evaluando la actividad citolítica. Un nivel de proliferación que sea al menos dos veces mayor y/o un nivel de actividad citolítica que sea al menos un 20% mayor que dichos niveles en pacientes exentos de enfermedad indica la presencia de un cáncer en el paciente.

Como se indicó anteriormente, un cáncer puede ser también o alternativamente detectado basándose en el nivel de mRNA que codifica una proteína de tumor de mama en una muestra biológica. 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, en que al menos uno de los cebadores oligonucleotídicos es específico para (es decir, se hibrida con) un polinucleótido que codifica la proteína de tumor de mama. El cDNA multiplicado es luego separado y detectado usando técnicas bien conocidas en este campo técnico, tal como una electroforesis en gel. Similarmente, se pueden usar sondas oligonucleotídicas que se hibridan específicamente con un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama, en un ensayo de hibridación, para detectar la presencia de un polinucleótido que codifica la proteína tumoral en una muestra biológica.

Para permitir la hibridación bajo las condiciones de ensayo, los cebadores y sondas oligonucleotídicos deberían comprender una secuencia oligonucleotídica que tuviera una identidad de al menos aproximadamente 60%, preferiblemente al menos aproximadamente 75% y más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, con respecto a una porción de un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama que tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos, y preferiblemente al menos 20 nucleótidos. Preferiblemente, los cebadores y/o sondas oligonucleotídicos se hibridarán con un polinucleótido que codifica un polipéptido aquí descrito bajo unas condiciones moderadamente rigurosas, como se definió anteriormente. Los cebadores y/o sondas oligonucleotídicos que se pueden emplear útilmente 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 1-175, 178, 180 y 182-468. Las técnicas tanto para los ensayos basados en PCR como para los 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; y Erlich (redactor), *PCR Technology*, Stockton Press, New York, 1989).

En un ensayo preferido se emplea una RT-PCR, en la que se aplica una PCR junto con una transcripción inversa. Típicamente, se extrae RNA de una muestra biológica, tal como tejido de biopsia, y se somete a transcripción inversa para producir moléculas de cDNA. Una multiplicación por PCR utilizando 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 tomadas de un paciente de ensayo y de un individuo que no está aquejado de cáncer. La reacción de multiplicación puede ser llevada a cabo sobre diversas diluciones de cDNA que abarquen dos órdenes de magnitud. Típicamente, se considera positivo un aumento de expresión del doble o más en las diversas diluciones de la muestra del paciente de ensayo en comparación con las mismas diluciones de la muestra no cancerosa.

En otra realización, las composiciones descritas pueden ser usadas como marcadores para el progreso del cáncer. En esta realización, se pueden llevar a cabo a lo largo del tiempo ensayos como los anteriormente descritos para el diagnóstico de un cáncer y se puede evaluar el cambio en el nivel del (de los) polipéptido(s) o del polinucleótido reactivos. 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, conforme 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.

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

Como se indicó anteriormente, para mejorar la sensibilidad, se pueden examinar múltiples marcadores de proteínas de tumor de mama en una muestra dada. Resultará evidente que en un solo ensayo se pueden combinar agentes ligantes específicos para diferentes proteínas aquí proporcionadas. Además, se pueden usar concurrentemente múltiples cebadores o sondas. La selección de los marcadores de proteínas tumorales se puede basar en experimentos rutinarios para determinar las combinaciones que dan 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.

#### Kits diagnósticos

El presente invento proporciona además kits para uso en cualquiera de los anteriores métodos diagnósticos. Dichos kits comprenden típicamente dos o más componentes necesarios para llevar un ensayo diagnóstico a cabo. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, recipientes y/o un equipo. Por ejemplo, un recipiente de un kit puede contener un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína de tumor de mama. Dichos anticuerpos o fragmentos se pueden proporcionar fijados a un material de soporte, como se describió anteriormente. Uno o más recipientes adicionales pueden encerrar elementos, tales como reactivos o tampones, que se van a usar en el ensayo. Dichos kits pueden contener también, o alternativamente, un reactivo de detección como el anteriormente descrito que contenga un grupo informador adecuado para la detección directa o indirecta de la unión de anticuerpos.

Alternativamente, se puede diseñar un kit para detectar el nivel de mRNA que codifica una proteína de tumor de mama en una muestra biológica. Dichos kits 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 se puede utilizar, por ejemplo, en una PCR o un ensayo de hibridación. Los componentes adicionales que pueden estar presentes en dichos kits incluyen un segundo oligonucleótido y/o un reactivo diagnóstico o recipiente para facilitar la detección de un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama.

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

#### 60 EJEMPLOS

##### Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de polipéptidos de tumor de mama

En este ejemplo se describe el aislamiento de polipéptidos de tumor de mama procedentes de un banco de cDNA de tumor de mama.

5 Se aislaron clones de cDNA que están sobreexpresados en tejido de tumor de mama, a partir de bancos de sustracción de cDNA de mama, del modo siguiente. Se prepararon bancos de sustracción de mama, del modo anteriormente descrito, por sustracción basada en PCR empleando colecciones de cDNA de tumor de mama como comprobador y colecciones de cDNA de mama normal o cDNA de otros tejidos normales como conductor. Se tomaron aleatoriamente clones de cDNA de la sustracción de mama y se multiplicaron mediante PCR de colonias, y se determinaron sus niveles de expresión de mRNA en tumor de mama, mama normal y otros diversos tejidos normales usando la tecnología de micromatrices anteriormente descrita. Se halló que veinticuatro clones de cDNA distintos estaban sobreexpresados en tumor de mama y expresados con bajos niveles en todos los tejidos normales examinados (mama, cerebro, hígado, páncreas, pulmón, glándula salival, estómago, colon, riñón, médula ósea, músculo esquelético, PBMC, corazón, intestino delgado, glándula suprarrenal, médula espinal, intestino grueso y piel). En la ID. SEC. nº 71 se proporciona la determinada secuencia parcial de cDNA de uno de estos clones. No se hallaron homologías significativas al comparar la secuencia de ID. SEC. nº 71 con las secuencias del banco de genes usando las bases de datos de EMBL y GenBank (Emisión 97).

20 Se aislaron tres isoformas de DNA para el clon B726P (secuencia parcial proporcionada en la ID. SEC. nº 71) del modo siguiente. Se sintetizó una sonda radiactiva a partir de B726P cortando DNA de B726P de un vector pT7Blue (Novagen) mediante una digestión de restricción con BamHI/XbaI, y usando el DNA resultante como molde en una PCR de cadena sencilla en presencia de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP. En la ID. SEC. nº 177 se proporciona la secuencia del cebador empleado para esta PCR. Se usó la sonda radiactiva resultante para sondear un banco de cDNA direccional y un banco de cDNA aleatoriamente cebado, preparados usando RNA aislado de tumores de mama. Ochenta y cinco clones fueron identificados, escindidos, purificados y secuenciados. Se halló que, de estos 85 clones, tres contenían un significativo marco de lectura abierto. En la ID. SEC. nº 175 se proporciona la determinada secuencia de cDNA de la isoforma B726P-20, proporcionándose en la ID. SEC. nº 176 la correspondiente secuencia prevista de aminoácidos. En la ID. SEC. nº 178 se proporciona la determinada secuencia de cDNA de la isoforma B726P-74, proporcionándose en la ID. SEC. nº 179 la correspondiente secuencia prevista de aminoácidos. En la ID. SEC. nº 180 se proporciona la determinada secuencia de cDNA de la isoforma B726P-79, proporcionándose en la ID. SEC. nº 181 la correspondiente secuencia prevista de aminoácidos.

35 Los esfuerzos para obtener un clon de longitud completa de B726P usando técnicas estándares condujeron al aislamiento de cinco clones adicionales que representan una secuencia 5' adicional de B726P. Parece que estos clones son formas de corte y empalme alternativas del mismo gen. En las ID. SEC. números 464-468 se proporcionan las determinadas secuencias de cDNA de estos clones, proporcionándose en las ID. SEC. números 470-473, respectivamente, las previstas secuencias de aminoácidos codificadas por las ID. SEC. números 464-467. Utilizando técnicas informáticas estándares, se creó una secuencia de DNA de consenso de 3681 pares de bases (ID. SEC. nº 463) que contiene dos grandes marcos de lectura abiertos. El ORF cadena abajo codifica la prevista secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 181. En la ID. SEC. nº 469 se proporciona la prevista secuencia de aminoácidos codificada por el ORF cadena arriba.

## Ejemplo 2

### 45 Síntesis de polipéptidos

Se pueden sintetizar polipéptidos en un sintetizador peptídico Perkin Elmer/Applied Biosystems Division 430<sup>a</sup> usando la química de Fmoc con activación por HPTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio. Se puede fijar una secuencia Gly-Cys-Gly al extremo amínico del péptido para proporcionar un método de conjugación, unión a una superficie inmovilizada, o marcación del péptido. La escisión de los péptidos del soporte sólido puede ser llevada a cabo usando la siguiente mezcla de escisión: ácido trifluoroacético:etanoditiol:tioanisol:agua:fenol (40:1:2:2:3). Después de una escisión durante 2 horas, los péptidos pueden ser precipitados en metil-t-butil-éter frío. Luego se pueden disolver los sedimentos peptídicos en agua que contiene ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y se pueden liofilizar antes de una purificación por HPLC en fase inversa C18. Para eluir los péptidos, se puede usar un gradiente de acetonitrilo al 0%-60% (que contiene TFA al 0,1%) en agua (que contiene TFA al 0,1%). Después de la liofilización de las fracciones puras, los péptidos pueden ser caracterizados usando electropulverización u otros tipos de espectrometría de masas y mediante un análisis de aminoácidos.

60 A partir de lo precedente, se apreciará que, aunque aquí se han descrito realizaciones específicas del invento con fines de ilustración, se pueden realizar diversas modificaciones.

**LISTA DE SECUENCIAS**

	<110>	Corixa Corporation Yujie, Jiang Dillon, Davin C.	
5		Mitcham, Jennifer L. Xu, Jiangchun Harlocker, Susan L.	
10	<120>	COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA, Y MÉTODOS PARA SU USO	
	<130>	210121.47001PC	
15	<140>	PCT	
	<141>	2000-02-15	
	<160>	474	
20	<170>	FastSEQ para Windows, versión 3.0	
	<210>	71	
	<211>	618	
	<212>	DNA	
25	>213>	<i>Homo sapiens</i>	
	<400>	71	
		gttgcagtga gctcaagtgt tgggtgtatc agctcaaac accatgtgat gccaatcatc 60	
		tccacaggag caatttgttt accttttttt tctgatgctt tactaacttc atcttttaga 120	
		tttaaatcat tagtagatcc tagaggagcc agtttcagaa aatatagatt ctagtccagc 180	
		accacccgta gttgtgcatt gaaataatta tcattatgat tatgtatcag agcttctggg 240	
		tttctcattc tttattcatt tattcaacaa ccactgtgaca aacactggaa ttacaggatg 300	
		aagatgagat aatccgctcc ttggcagtgt tatactatta tataacctga aaaaacaaac 360	
		agtaaathtt cacacaaagt aatagatata tatakacatt taaaataggg cactactgga 420	
		acacacagat aggacatcca ggttttgggt caatattgta gactttttgg tggatgagat 480	
		atgcaggttg atrccagaag gacaacaaaa acatatgtca gatagaaggg aggagcaaat 540	
		gccaaagagct ggagctgagg aagatcactg tgaatttcta tgtagtctag ttggctggat 600	
		gctagagcaa agaggtgg	618
30	<210>	175	
	<211>	1206	
	<212>	DNA	
	>213>	<i>Homo sapiens</i>	
	<400>	175	
		ggcacgagga agttttgtgt actgaaaaag aaactgtcag aagcaaaaga aataaaatca 60	
		cagttagaga accaaaaagt taaatgggaa caagagctct gcagtgtgag gtttctcaca 120	
		ctcatgaaaa tgaaaattat ctcttacatg aaaattgcat gttgaaaaag gaaattgcca 180	
		tgctaaaact ggaaatagcc aactgaaac accaatacca ggaaaaggaa aataaatact 240	
		ttgaggacat taagatttta aaagaaaaga atgctgaact tcagatgacc ctaaaactga 300	
		aagaggaatc attaaactaa agggcatctc aatatagtggt gcagcttaa gttctgatag 360	
		ctgagaacac aatgctcact tctaaattga aggaaaaaca agacaaagaa atactagagg 420	
		cagaaattga atcacacat cctagactgg cttctgctgt acaagacat gatcaaatg 480	
		tgacatcaag aaaaagtcaa gaacctgctt tccacattgc aggagatgct tgtttgcaaa 540	
		gaaaaatgaa tgttgatgtg agtagtacga tatataacaa tgaggtgctc catcaaccac 600	
		tttctgaagc tcaaaggaaa tccaaaagcc taaaaataag tctcaattat gccggagatg 660	
		ctctaagaga aaatacattg gtttcagaac atgcacaaag agaccaactg gaaacacagt 720	
		gtcaaatgaa ggaagctgaa cacatgtatc aaaacgaaca agataatgtg aacaaacaca 780	
		ctgaacagca ggagtctcta gatcagaaat tatttcaact acaaagcaaa aatatgtggc 840	
		ttcaacagca attagttcat gcacataaga aagctgacaa caaaagcaag ataacaattg 900	
		atattcattt tcttgagagg aaaatgcaac atcatctcct aaaagagaaa aatgaggaga 960	
35		tatttaatta caataacat ttaaaaaacc gtatatatca atatgaaaa gagaaagcag 1020	

```

aacagaagt tatataatag tataacactg ccaaggagcg gattatctca tcttcacct 1080
gtaattccag tgtttgtcac gtggttggtg aataaatgaa taaagaatga gaaaaccaga 1140
agctctgata cataatcata atgataatta tttcaatgca caactacggg tgggtgctgct 1200
cgtgcc 1206

```

5 <210> 176  
 <211> 317  
 <212> PRT  
 >213> *Homo sapiens*

```

<400> 176
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
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
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
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
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
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
Leu Val His Ala His Lys Lys Ala Asp Asn Lys Ser Lys Ile Thr Ile
260     265     270
Asp Ile His Phe Leu Glu Arg Lys Met Gln His His Leu Leu Lys Glu
275     280     285
Lys Asn Glu Glu Ile Phe Asn Tyr Asn Asn His Leu Lys Asn Arg Ile
290     295     300
Tyr Gln Tyr Glu Lys Glu Lys Ala Glu Thr Glu Val Ile
305     310     315

```

10 <210> 177  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 >213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Hecho en el Laboratorio

<400> 177

ccaatcatct ccacaggagc

20

5

<210> 178

<211> 1665

<212> DNA

>213> *Homo sapiens*

<400> 178

gcaaaactttc	aagcagagcc	tcccgagaag	ccatctgcct	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
acagttcatt	cttgtgaaaag	agcaagggaa	cttcaaaaag	atcactgtga	acaacgtaca	360
ggaaaaatgg	aacaaatgaa	aaagaagttt	tgtgtactga	aaaagaaact	gtcagaagca	420
aaagaaataa	aatcacagtt	agagaaccaa	aaagttaaat	gggaacaaga	gctctgcagt	480
gtgaggtttc	tcacactcat	gaaaatgaaa	attatctctt	acatgaaaat	tgcattgtga	540
aaaaggaaat	tgccatgcta	aaactggaaa	tagccacact	gaaacaccaa	taccaggaaa	600
aggaaaataa	atactttgag	gacattaaga	ttttaaaga	aaagaatgct	gaacttcaga	660
tgaccctaaa	actgaaagag	gaatcattaa	ctaaaagggc	atctcaatat	agtgggcagc	720
ttaaagttct	gatagctgag	aacacaatgc	tcacttctaa	attgaaggaa	aaacaagaca	780
aagaaatact	agaggcagaa	attgaatcac	accatcctag	actggcttct	gctgtacaag	840
accatgatca	aattgtgaca	tcaagaaaaa	gtcaagaacc	tgctttccac	attgcaggag	900
atgcttggtt	gcaaagaaaa	atgaatggtg	atgtgagtag	tacgatatat	aacaatgagg	960
tgctccatca	accactttct	gaagctcaaa	ggaaatccaa	aagcctaaaa	attaatctca	1020
attatgcccg	agatgctcta	agagaaaata	cattggtttc	agaacatgca	caaagagacc	1080
aacgtgaaac	acagtgtcaa	atgaaggaag	ctgaacacat	gtatcaaac	gaacaagata	1140
atgtgaacaa	acacactgaa	cagcaggagt	ctctagatca	gaaattatct	caactacaaa	1200
gcaaaaatat	gtggcttcaa	cagcaattag	ttcatgcaca	taagaaagct	gacaacaaaa	1260
gcaagataac	aattgatatt	cattttcttg	agaggaaaat	gcaacatcat	ctcctaaaag	1320
agaaaaatga	ggagatattt	aattacaata	accatttaaa	aaaccgtata	tatcaatatg	1380
aaaaagagaa	agcagaaaca	gaaaactcat	gagagacaag	cagtaagaaa	cttcttttgg	1440
agaacaaca	gaccagatct	ttactcacia	ctcatgctag	gaggccagtc	ctagcattac	1500
cttatgttga	aaatcttacc	aatagtctgt	gtcaacagaa	tacttatttt	agaagaaaaa	1560
ttcatgattt	cttccrtaag	cctgggcgac	agagcgagac	tctgrctcaa	aaaaaaaaaa	1620
aaaaaaagaa	agaaaagaaat	gcctgtgctt	acttcgcttc	ccagg		1665

10

<210> 179

<211> 179

<212> PRT

15

>213> *Homo sapiens*

<400> 179

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			
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	
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		

ES 2 368 899 T3

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  
 Val Arg Phe Leu Thr Leu Met Lys Met Lys Ile Ile Ser Tyr Met Lys  
 165 170 175  
 Ile Ala Cys

5 <210> 180  
 <211> 1681  
 <212> DNA  
 >213> *Homo sapiens*

<400> 180

gatacagtc tctctgtgaa agagcaaggg aacttcaaaa agatcactgt gaacaacgta 60  
 caggaaaaat ggaacaaatg aaaaagaagt tttgtgtact gaaaaagaaa ctgtcagaag 120  
 caaaagaaat aaaatcacag ttagagaacc aaaaagttaa atgggaacaa gagctctgca 180  
 gtgtgagatt gactttaaac caagaagaag agaagagaag aaatgccgat atattaatg 240  
 aaaaaattag ggaagaatta ggaagaatcg aagagcagca taggaaagag ttagaagtga 300  
 aacaacaact tgaacaggct ctcagaatac aagatataga attgaagagt gtagaaagta 360  
 atttgaatca ggtttctcac actcatgaaa atgaaaatta tctcttacat gaaaattgca 420  
 tgttgaaaaa ggaaattgcc atgctaaaac tggaaatagc cacactgaaa caccaatacc 480  
 aggaaaagga aaataaatac tttgaggaca ttaagatttt aaaagaaaag aatgctgaac 540  
 ttcagatgac cctaaaactg aaagaggaat cattaactaa aagggcatct caatatagtg 600  
 ggcagcttaa agttctgata gctgagaaca caatgctcac ttctaaattg aaggaaaaac 660  
 aagacaaaga aatactagag gcagaaattg aatcacacca tcctagactg gcttctgctg 720  
 tacaagacca tgatcaaatt gtgacatcaa gaaaaagtca agaaccctgct tccacattg 780  
 caggagatgc ttgtttgcaa agaaaaatga atggtgatgt gagtagtacg atatataaca 840  
 atgaggtgct ccatcaacca ctttctgaag ctcaaaggaa atccaaaagc ctaaaaatta 900  
 atctcaatta tgccggagat gctctaagag aaaatacatt ggtttcagaa catgcacaaa 960  
 gagaccaacg tgaaacacag tgtcaaatga aggaagctga acacatgtat caaaacgaac 1020  
 aagataatgt gaacaaacac actgaacagc aggagtctct agatcagaaa ttatttcaac 1080  
 tacaagcaaa aaatatgtgg cttcaacagc aattagttca tgcacataag aaagctgaca 1140  
 acaaaagcaa gataacaatt gatattcatt tctctgagag gaaaatgcaa catcatctcc 1200  
 taaaagagaa aaatgaggag atattttaatt acaataacca tttaaaaaac cgtatataatc 1260  
 aatatgaaaa agagaaagca gaaacagaaa actcatgaga gacaagcagt aagaaacttc 1320  
 ttttgagaaa acaacagacc agatctttac tcacaactca tgctaggagg ccagtccttag 1380  
 cattacctta tgttgaaaaa tcttaccat agtctgtgtc aacagaatac ttattttaga 1440  
 agaaaaattc atgatttctt cctgaagcct acagacataa aataacagtg tgaagaatta 1500  
 cttgttcaag aattgcataa aagctgcccc ggatttccat ctaccctgga tgatgccgga 1560  
 gacatcattc aatccaacca gaatctcgct ctgtcactca ggctggagtg cagtgggagc 1620  
 aatctcggct cactgcaact ctgcctcccc gggttcacgcc attctctggc acagcctccc 1680  
 g 1681

10  
 15 <210> 181  
 <211> 432  
 <212> PRT  
 >213> *Homo sapiens*

<400> 181

Asp Thr Val His Ser Cys Glu Arg Ala Arg Glu Leu Gln Lys Asp His  
 1 5 10 15  
 Cys Glu Gln Arg Thr Gly Lys Met Glu Gln Met Lys Lys Lys Phe Cys  
 20 25 30

Val Leu Lys Lys Lys Leu Ser Glu Ala Lys Glu Ile Lys Ser Gln Leu  
 35 40 45  
 Glu Asn Gln Lys Val Lys Trp Glu Gln Glu Leu Cys Ser Val Arg Leu  
 50 55 60  
 Thr Leu Asn Gln Glu Glu Glu Lys Arg Arg Asn Ala Asp Ile Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Ile Arg Glu Glu Leu Gly Arg Ile Glu Glu Gln His Arg Lys  
 85 90 95  
 Glu Leu Glu Val Lys Gln Gln Leu Glu Gln Ala Leu Arg Ile Gln Asp  
 100 105 110  
 Ile Glu Leu Lys Ser Val Glu Ser Asn Leu Asn Gln Val Ser His Thr  
 115 120 125  
 His Glu Asn Glu Asn Tyr Leu Leu His Glu Asn Cys Met Leu Lys Lys  
 130 135 140  
 Glu Ile Ala Met Leu Lys Leu Glu Ile Ala Thr Leu Lys His Gln Tyr  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Glu Asp Ile Lys Ile Leu Lys Glu  
 165 170 175  
 Lys Asn Ala Glu Leu Gln Met Thr Leu Lys Leu Lys Glu Glu Ser Leu  
 180 185 190  
 Thr Lys Arg Ala Ser Gln Tyr Ser Gly Gln Leu Lys Val Leu Ile Ala  
 195 200 205  
 Glu Asn Thr Met Leu Thr Ser Lys Leu Lys Glu Lys Gln Asp Lys Glu  
 210 215 220  
 Ile Leu Glu Ala Glu Ile Glu Ser His His Pro Arg Leu Ala Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Val Gln Asp His Asp Gln Ile Val Thr Ser Arg Lys Ser Gln Glu Pro  
 245 250 255  
 Ala Phe His Ile Ala Gly Asp Ala Cys Leu Gln Arg Lys Met Asn Val  
 260 265 270  
 Asp Val Ser Ser Thr Ile Tyr Asn Asn Glu Val Leu His Gln Pro Leu  
 275 280 285  
 Ser Glu Ala Gln Arg Lys Ser Lys Ser Leu Lys Ile Asn Leu Asn Tyr  
 290 295 300  
 Ala Gly Asp Ala Leu Arg Glu Asn Thr Leu Val Ser Glu His Ala Gln  
 305 310 315 320  
 Arg Asp Gln Arg Glu Thr Gln Cys Gln Met Lys Glu Ala Glu His Met  
 325 330 335  
 Tyr Gln Asn Glu Gln Asp Asn Val Asn Lys His Thr Glu Gln Gln Glu  
 340 345 350  
 Ser Leu Asp Gln Lys Leu Phe Gln Leu Gln Ser Lys Asn Met Trp Leu  
 355 360 365  
 Gln Gln Gln Leu Val His Ala His Lys Lys Ala Asp Asn Lys Ser Lys  
 370 375 380  
 Ile Thr Ile Asp Ile His Phe Leu Glu Arg Lys Met Gln His His Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Lys Glu Lys Asn Glu Glu Ile Phe Asn Tyr Asn Asn His Leu Lys  
 405 410 415  
 Asn Arg Ile Tyr Gln Tyr Glu Lys Glu Lys Ala Glu Thr Glu Asn Ser  
 420 425 430

<210> 463  
 <211> 3681  
 <212> DNA  
 >213> *Homo sapiens*

5

<400> 463  
 tccgagctga ttacagacac caaggaagat gctgtaaaga gtcagcagcc acagccctgg 60  
 cttagctggcc ctgtgggcat ttattagtaa agttttaatg acaaaagctt tgagtcaaca 120  
 caccctgggg taattaacct ggatcatcccc accctggaga gccatcctgc ccatgggtga 180  
 tcaaagaagg aacatctgca ggaacacctg atgaggctgc acccttggcg gaaagaacac 240

ctgacacagc tgaaaagcttg gtggaaaaaa cacctgatga ggctgcaccc ttgggtggaaa 300  
 gaacacctga cacggctgaa agcttgggtg aaaaaacacc tgatgaggct gcatccttgg 360  
 tggagggaaac atctgacaaa attcaatgtt tggagaaagc gacatctgga aagttcgaac 420  
 agtcagcaga agaaacacct agggaaatta cgagtcctgc aaaagaaaca tctgagaaat 480  
 ttacgtggcc agcaaaagga agacctagga agatcgcatg ggagaaaaaa gaagacacac 540  
 ctagggaat tatgagtccc gcaaaagaaa catctgagaa atttacgtgg gcagcaaaag 600  
 gaagacctag gaagatcgca tgggagaaaa aagaaacacc tgtaaagact ggatgcgtgg 660  
 caagagtac atctaataaa actaaagttt tggaaaaagg aagatctaag atgattgcat 720  
 gtccacaaa agaatacatct acaaaagcaa gtgccaatga tcagaggttc ccatcagaat 780  
 ccaacaaga ggaagatgaa gaataattctt gtgattctctg gagtctctt gagagttctg 840  
 caaagattca agtgtgtata cctgagtcta tatatcaaaa agtaatggag ataaatagag 900  
 aagtgaag gctcctctaa aagccatctg ccttcaagcc tgccattgaa atgcaaaact 960  
 ctgttccaaa taaagccttt gaattgaaga attgagagca gatccgtagt 1020  
 tcccaccaga atccaaacaa aaggactatg aagaaaattc ttgggattct gagagctctc 1080  
 gtgagactgt ttacagaaag gatgtgtgtt tacccaaggc tacacatcaa aaagaaatag 1140  
 ataaaataaa tggaaaatta gaagagtctc ctaataaaga tggctctctg aaggctacct 1200  
 gcggaatgaa agtttctatt ccaactaaag ccttagaatt gaaggacatg caaactttca 1260  
 aagcagagcc tccggggaag ccatctgcct tcgagcctgc cactgaaatg caaaagtctg 1320  
 tcccaaataa agccttggaa ttgaaaaatg aacaaacatt gagagcagat gagatactcc 1380  
 catcagaatc caaacaanaag gactatgaag aaagtctctg ggattctgag agtctctgtg 1440  
 agactgtttc acagaaggat gtgtgtttac ccaaggctrc rcatcaaaaa gaaatagata 1500  
 aaataaatgg aaaattagaa gggctctctg ttaaagatgg tcttctgaag gctaactcgc 1560  
 gaatgaaagt ttctattcca actaaagcct tagaattgat ggacatgcaa actttcaaag 1620  
 cagagcctcc cgagaagcca tctgcctctg agcctgccat tgaatgcaa aagtctgttc 1680  
 caaataaagc cttggaattg aagaatgaac aaacattgag agcagatgag atactcccat 1740  
 cagaatccaa acaaaaggac tatgaagaaa gttcttggga ttctgagagt ctctgtgaga 1800  
 ctgtttcaca gaaggatgtg tgtttaccca aggctrcrca tcaaaaagaa atagataaaa 1860  
 taaatggaaa attagaagag tctcctgata atgatggttt tctgaaggct cctgcagaa 1920  
 tgaaagtctc tattccaact aaagccttag aattgatgga catgcaaaact ttcaaagcag 1980  
 agcctcccga gaagccatct gccttcgagc ctgccattga aatgcaaaaag tctgttccaa 2040  
 ataaagcctt ggaattgaag aatgaacaaa cattgagagc agatcagatg ttcccttcag 2100  
 aatcaaaaac aaagaasgtt gaagaaaatt cttgggattc tgagagctc cgtgagactg 2160  
 tttcacagaa ggaatgtgtg gtacccaagg ctacacatca aaaagaaatg gataaaaata 2220  
 gtgtcaaaat agaagattca actagcctat caaaaatctt ggatacagtt cattctgtg 2280  
 aaagagcaag ggaacttcaa aaagatcact gtgaacaacg tacaggaaaa atggaacaaa 2340  
 tgaaaaagaa gttttgtgta ctgaaaaaga aactgtcaga agcaaaaagaa ataaaatcac 2400  
 agttagagaa ccaaaaagtt aatgggaac aagagctctg cagtgtgagg tttctcacac 2460  
 tcatgaaat gaaaattatc tcttacatga aaattgcatg ttgaaaagg aaattgccat 2520  
 gctaaaactg gaaatagcca cactgaaaca ccaataccag gaaaaggaaa ataaatactt 2580  
 tgaggacatt aagattttaa aagaaaagaa tgctgaactt cagatgaccc taaaactgaa 2640  
 agaggaatca ttaactaaaa gggcatctca atatagtggg cagcttaaag ttctgatagc 2700  
 tgagaacaca atgctcactt ctaaattgaa ggaaaaacaa gacaaaagaa tactagaggc 2760  
 agaattgaa tcacaccatc ctgactggc ttctgtctga caagaccatg atcaaattgt 2820  
 gacatacaag aaaagtcaag aacctgcttt ccacattgca ggagatgctt gtttgcaag 2880  
 aaaaatgaat gttgatgtga gtagtacgat atataacaat gaggtgctcc atcaaccact 2940  
 ttctgaagct caaaggaat ccaaaagcct aaaaattaat ctcaattatg cmggagatgc 3000  
 tctaagagaa aatacattgg tttcagaaca tgcacaaaga gaccaacgtg aaacacagtg 3060  
 tcaaatgaag gaagctgaac acatgtatca aaacgaacaa gataatgtga acaaacacac 3120  
 tgaacagcag gagtctctag atcagaaatt atttcaacta caaagcaaaa atatgtggct 3180  
 tcaacagca ttagtctatg cacataagaa agctgacaac aaaagcaaga taacaattga 3240  
 tattcatttt cttgagagga aaatgcaaca tcatctccta aaagagaaaa atgaggagat 3300  
 atttaattac aataaccatt taaaaaccg tatatatcaa tatgaaaaag agaaagcaga 3360  
 aacagaaaac tcatgagaga caagcagtaa gaaactctt ttggagaaac aacagaccag 3420  
 atctttactg acaactcatg ctaggaggcc agtccatgca tcacctatg ttgaaaactc 3480  
 tacciaatgt ctgtgtcaac agaatactta ttttagaaga aaaattcatg atttctctc 3540  
 gaagcctaca gatataaaa aacagtgtga agaattactt gttcacgaat tgcataaagc 3600  
 tgcacaggat tcccatctac cctgatgatg cagcagacat cattcaatcc aaccagaatc 3660  
 tcgctctgtc actcaggctg g 3681

<210> 464  
 <211> 1424  
 <212> DNA  
 >213> *Homo sapiens*

5

<400> 464  
 tccgagctga ttacagacac caaggaagat gctgtaaaga gtcagcagcc acagccctgg 60  
 ctagctggcc ctgtgggcat ttattagtaa agttttaatg acaaaaagctt tgagtcaaca 120  
 caccctggtg taattaacct ggtcatcccc accctggaga gccatcctgc ccatgggtga 180  
 tcaaagaagg aacatctgca ggaacacctg atgaggctgc acccttggcg gaaagaacac 240  
 ctgacacagc tgaaagcttg gtggaaaaaa cacctgatga ggctgcaccc ttgggtggaaa 300  
 gaacacctga cacggctgaa agcttgggtg aaaaaacacc tgatgaggct gcatccttgg 360  
 tggaggggaa atctgacaaa attcaatggt tggagaaagc gacatctgga aagttcgaac 420  
 agtcagcaga agaaacacct agggaaatta cgagtcctgc aaaagaaaca tctgagaaat 480  
 ttacgtggcc agcaaaagga agacctagga agatcgcatg ggagaaaaaa gaagacacac 540  
 ctagggaatg tatgagtcct gcaaaagaaa catctgagaa atttacgtgg gcagcaaaag 600  
 gaagacctag gaagatcgca tgggagaaaa aagaaacacc tgtaaagact ggatgcgtgg 660  
 caagagtaac atctaataaa actaaagtgt tggaaaaagg aagatctaag atgattgcat 720  
 gtcctacaaa agaatcatct acaaaaagcaa gtgccaatga tcagagggtc ccatcagaat 780  
 ccaaaacaaga ggaagatgaa gaatatctct gtgattctct gagtctctt gagagtctct 840  
 caaagattca agtgtgtata cctgagtcta tatatcaaaa agtaatggag ataaatagag 900  
 aagtagaaga gcctcctaag aagccatctg ccttcaagcc tgccattgaa atgcaaaact 960  
 ctgttccaaa taaagccttt gaattgaaga atgaacaaac attgagagca gatccgatgt 1020  
 tcccaccaga atccaaacaa aaggactatg aagaaaattc ttgggattct gagagtctct 1080  
 gtgagactgt ttcacagaag gatgtgtgtt tacccaaggc tacacatcaa aaagaaatag 1140  
 ataaaataaa tggaaaatta gaaggtaaga accgtttttt atttaaaaat cagttgacct 1200  
 aatatttctc taaactgatg aggggggata ccctctagta gctgaagaaa attacctctc 1260  
 aaatgcaaac catggaaaaa aagagaagtg caatggtcgt aagttgtatg tctcatcagg 1320  
 tgttggcaac agactgattt gagagtgtctg aaaaggagct gaattattag tttgaattca 1380  
 agatattgca agacctgaga gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1424

<210> 465  
 <211> 674  
 <212> DNA  
 >213> *Homo sapiens*

10

<400> 465  
 attccgagct gattacagac accaaggaag atgctgtaaa gagtcagcag ccacagccct 60  
 ggctagctgg ccctgtgggc atttattagt aaagttttaa tgacaaaagc tttgagtcaa 120  
 cacaccctgt ggtaattaac ctggctatcc ccaccctgga gagccatcct gcccatgggt 180  
 gatcaaagaa ggaacatctg caggaacacc tgatgaggct gcacccttgg cggaaagaac 240  
 acctgacaca gctgaaagct tgggtgaaaa aacacctgat gaggctgcac ccttgggtgga 300  
 aagaacacct gacacggctg aaagcttggg ggaaaaaaca cctgatgagg ctgcatcctt 360  
 ggtggaggga acatctgaca aaattcaatg tttggagaaa gcgacatctg gaaagtctga 420  
 acagtcagca gaagaaacac ctagggaaat tacgagtcct gcaaaagaaa catctgagaa 480  
 atttacgtgg ccagcaaaag gaagacctag gaagatcgca tgggagaaaa aagatgactc 540  
 agttaaggca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660  
 aaaaaaaaaa aaaa 674

15

<210> 466  
 <211> 1729  
 <212> DNA  
 >213> *Homo sapiens*

20

<220>  
 <221> incierto  
 <222> (11)  
 <223> n = A, T, C o G  
 <221> incierto  
 <222> (1128)  
 <223> n = A, T, C o G

25

<400> 466  
 gaaagttcga ncagtcagca gaagaaacac ctagggaaat tacgagtcct gcaaaagaaa 60  
 catctgagaa atttacgtgg ccagcaaaag gaagacctag gaagatcgca tgggagaaaa 120  
 aagaagacac acctagggaa attatgagtc ccgcaaaaga aacatctgag aaatctacgt 180  
 gggcagcaaa aggaagacct aggaagatcg catgggagaa aaaagaaaca cctgtaaaga 240  
 ctggatgctg ggcaagagta acatctaata aactaaagt tttggaaaaa ggaagatcta 300  
 agatgattgc atgtctaca aaagaatcat ctacaaaagc aagtccaat gatcagaggt 360  
 tcccacaga atccaaaca gaggaagatg aagaatattc ttgtgattct cggagtctct 420  
 ttgagagtcc tgcaaaagatt caagtgtgta tacctgagtc tatatatcaa aaagtaattgg 480  
 agataaatag agaagtagaa gagcctccta agaagccatc tgccttcaag cctgccattg 540  
 aaatgcaaaa ctctgttcca aataaagcct ttgaattgaa gaatgaaca acattgagag 600  
 cagatccgat gtccccacca gaatccaaac aaaaggacta tgaagaaaat tcttgggatt 660  
 ctgagagtcct ctgtgagact gtttcacaga aggatgtgtg tttacccaag gctacacatc 720  
 aaaaagaaat agataaaaata aatggaaaat tagaagagtc tcctaataaa gatggctctc 780  
 tgaaggctac ctgcggaatg aaagtttcta ttccaactaa agccttagaa ttgaaggaca 840  
 tgcaaaacttt caaagcagag cctccgggga agccatctgc cttcgagcct gccactgaaa 900  
 tgcaaaagtc tgtcccaaat aaagccttgg aatrgaaaaa tgaacaaaca ttgagagcag 960  
 atgagatact cccatcagaa tccaaacaaa aggactatga agaaaattct tgggatactg 1020  
 agagtctctg tgagactgtt tcacagaagg atgtgtgttt 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  
 agatactccc atcagaatcc aaacaaaagg actatgaaga aagttcttgg gattctgaga 1380  
 gtctctgtga gactgtttca cagaaggatg tgtgtttacc caaggctgcg catcaaaaag 1440  
 aaatagataa aataaatgga aaattagaag gtaagaaccg ttttttattt aaaaatcatt 1500  
 tgaccaataa tttctctaaa ttgatgagga aggatatcct ctagtagctg aagaaaatta 1560  
 cctcctaaat gcaaacatg gaaaaaaaaga gaagtgcaat ggtcataagc tatgtgtctc 1620  
 atcaggcatt ggcaacagac tatattgtga gtgctgaaga ggagctgaat tactagttta 1680  
 aattcaagat attccaagac gtgaggaaaa tgagaaaaaa aaaaaaaaaa 1729

- 5 <210> 467
- <211> 1337
- <212> DNA
- >213> *Homo sapiens*

10 <400> 467  
 aaaaagaaat agataaaaata aatggaaaat tagaagggtc tcctgttaaa gatggctctc 60  
 tgaaggctaa ctgcggaatg aaagtttcta ttccaactaa agccttagaa ttgatggaca 120  
 tgcaaaacttt caaagcagag cctcccgaga agccatctgc cttcgagcct gccattgaaa 180  
 tgcaaaagtc tgttccaaat aaagccttgg aattgaagaa tgaacaaaca ttgagagcag 240  
 atgagatact cccatcagaa tccaaacaaa aggactatga agaaagttct tgggattctg 300  
 agagtctctg tgagactgtt tcacagaagg atgtgtgttt acccaaggct gcgcatcaaa 360  
 aagaaataga taaaataaat ggaaaattag aagagtctcc tgataatgat ggttttctga 420  
 aggctccctg cagaatgaaa gtttctattc caactaaagc cttagaattg atggacatgc 480  
 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  
 cagttcattc ttgtgaaaga gcaagggaac ttcaaaaaga tcaactgtgaa caacgtacag 840  
 gaaaaatgga acaaatgaaa aagaagtttt gtgtactgaa aaagaaaactg tcagaagcaa 900  
 aagaaataaa atcacagtta gagaaccaa aagttaaatg ggaacaagag ctctgcagtg 960  
 tgagattgac tttaaaccaa gaagaagaga agagaagaaa tgccgatata ttaaatgaaa 1020  
 aaattaggga agaattagga agaatcgaag agcagcatag gaaagagtta gaagtgaac 1080  
 acaacttga acaggctctc agaatacaag atatagaatt gaagagtgtg gaaagtaatt 1140  
 tgaatcaggt ttctcacact catgaaaatg aaaattatct cttacatgaa aattgcatgt 1200  
 tgaaaaagga aattgccatg ctaaaactgg aaatagccac actgaaacac caataccagg 1260  
 aaaaggaaaa caataacttt gaggacatta agattttaa agaaaaaat gctgaacttc 1320  
 agatgacccc tcgtgcc 1337

<210> 468  
 <211> 2307  
 <212> DNA  
 >213> *Homo sapiens*

5

<400> 468  
 attgagagca gatgagatac tcccatcaga atccaaacaa aaggactatg aagaaagtcc 60  
 ttgggattct gagagtctct gtgagactgt ttcacagaag gatgtgtgtt tacccaaggc 120  
 tacacatcaa aaagaaatag ataaaaataa tggaaaatta gaagggcttc ctgttaaaga 180  
 tggctctctg aaggctaact gcggaatgaa agtttctatt ccaactaaag ccttagaatt 240  
 gatggacatg caaactttca aagcagagcc tcccgagaag ccatctgcct tcgagcctgc 300  
 cattgaaatg caaaagtctg ttccaaataa agccttggaa tgaagaatg aacaaacatt 360  
 gagagcagat gagatactcc catcagaatc caaacaaaag gactatgaag aaagttcttg 420  
 ggattctgag agtctctgtg agactgtttc acagaaggat gtgtgtttac ccaaggctac 480  
 acatcaaaaa gaaatagata aaataaatgg aaaattagaa gagtctcctg ataatgatgg 540  
 ttttctgaag tctccctgca gaatgaaagt ttctattcca actaaagcct tagaattgat 600  
 ggacatgcaa actttcaaag cagagcctcc cgagaagcca tctgccttcg agcctgccat 660  
 tgaatgcaa aagtctgttc caaataaagc cttggaattg aagaatgaac aaacattgag 720  
 agcagatcag atgttccctt cagaatcaa acaaaagaac gttgaagaaa atttctggga 780  
 ttctgagagc ctccgtgaga ctgtttcaca gaaggatgtg tgtgtacca aggctacaca 840  
 tcaaaaagaa atggataaaa taagtggaaa attagaagat tcaactagcc tatcaaaaat 900  
 cttggataca gttcattctt gtgaaagagc aagggaaactt caaaaagatc actgtgaaca 960  
 acgtacagga aaaatggaac aaatgaaaaa gaagttttgt gtactgaaaa agaaactgtc 1020  
 agaagcaaaa gaaataaaat cacagttaga gaaccaaaaa gttaaatggg aacaagagct 1080  
 ctgcagtgag aggtttctca cactcatgaa aatgaaaatt atctcttaca tgaaaattgc 1140  
 atgttgaaaa aggaaattgc catgctaaaa ctggaaatag ccacactgaa acaccaatac 1200  
 caggaaaagg aaaataaata ctttgaggac attaagattt taaaagaaaa gaatgctgaa 1260  
 cttcagatga ccctaaaact gaaagaggaa tcattaacta aaagggcatc tcaatatagt 1320  
 gggcagctta aagtctgat agctgagaac acaatgctca cttctaaatt gaaggaaaaa 1380  
 caagacaaag aaatactaga ggcagaaatt gaatcacacc atcctagact ggcttctgct 1440  
 gtacaagacc atgatcaaat tgtgacatca agaaaaagtc aagaacctgc tttccacatt 1500  
 gcaggagatg cttgtttgca aagaaaaatg aatgttgatg tgagtgtac gatataaac 1560  
 aatgaggtgc tccatcaacc actttctgaa gctcaaagga aatccaaaag cctaaaaatt 1620  
 aatctcaatt atgcaggaga tgctctaaga gaaaatacat tggtttcaga acatgcacaa 1680  
 agagaccaac gtgaaacaca gtgtcaaagt aaggaagctg aacacatgta tcaaacgaa 1740  
 caagataatg tgaacaaaca cactgaacag caggagtctc tagatcagaa attatttcaa 1800  
 ctacaaagca aaaatatgtg gcttcaacag caattagtcc atgcacataa gaaagctgac 1860  
 acaaaaagca agataacaat tgatattcat tttcttgaga ggaaaaatgca acatcatctc 1920  
 ctaaaagaga aaaatgagga gatatttaac tacaataacc atttaaaaaa ccgtatatat 1980  
 caatagaaa aagagaaagc agaaacagaa aactcatgag agacaagcag taagaaactt 2040  
 cttttggaga aacaacagac cagatcttta ctcaaacctc atgctaggag gccagctcta 2100  
 gcatcacctt atgttgaaaa tcttaccat agtctgtgtc aacagaatac ttattttaga 2160  
 agaaaaattc atgatttctt cctgaagcct acagacataa aataacagtg tgaagaatta 2220  
 cttgttcacg aattgcataa agctgcacag gattcccatc taccctgatg atgcagcaga 2280  
 catcattcaa tccaaccaga atctcgc 2307

10 <210> 469  
 <211> 650  
 <212> PRT  
 >213> *Homo sapiens*

15 <220>  
 <221> incierto  
 <222> (310)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido  
 20 <221> incierto  
 <222> (429)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido  
 <221> incierto  
 <222> (522)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido  
 25

ES 2 368 899 T3

<400> 469

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Trp Asp Ser Glu Ser Leu Cys Glu Thr Val Ser Gln Lys Asp Val  
290 295 300

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  
 Gly Met Lys Val Ser Ile Pro Thr Lys Ala Leu Glu Leu Met Asp Met  
 340 345 350  
 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  
 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  
 405 410 415  
 Thr Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Leu Pro Lys Ala Xaa His Gln Lys  
 420 425 430  
 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  
 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  
 485 490 495  
 Asn Lys Ala Leu Glu Leu Lys Asn Glu Gln Thr Leu Arg Ala Asp Gln  
 500 505 510  
 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  
 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  
 565 570 575  
 Glu Arg Ala Arg Glu Leu Gln Lys Asp His Cys Glu Gln Arg Thr Gly  
 580 585 590  
 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  
 Trp Glu Gln Glu Leu Cys Ser Val Arg Phe Leu Thr Leu Met Lys Met  
 625 630 635 640  
 Lys ile Ile Ser Tyr Met Lys Ile Ala Cys  
 645 650

<210> 470  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 >213> *Homo sapiens*

5

<400> 470  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 Arg Asp Ile Leu  
 225

10

<210> 471  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 >213> *Homo sapiens*

15

<220>  
 <221> incierto  
 <222> (148)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

20

<400> 471



ES 2 368 899 T3

115						120					125				
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
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				
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
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
		275						280							285
Ser	Trp	Asp	Thr	Glu	Ser	Leu	Cys	Glu	Thr	Val	Ser	Gln	Lys	Asp	Val
	290						295				300				
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
Gly	Met	Lys	Val	Ser	Ile	Pro	Thr	Lys	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Asp	Met
			340					345							350
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									380				
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
				405					410						415

ES 2 368 899 T3

Thr Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Leu Pro Lys Ala Ala His Gln Lys  
 420 425 430  
 Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Gly Lys Asn Arg Phe Leu  
 435 440 445  
 Phe Lys Asn His Leu Thr Lys Tyr Phe Ser Lys Leu Met Arg Lys Asp  
 450 455 460  
 Ile Leu  
 465

5 <210> 473  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 >213> *Homo sapiens*

<400> 473  
 Lys Glu Ile Asp Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Gly Ser Pro Val Lys  
 5 10 15  
 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  
 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  
 Glu Ile Leu Pro Ser Glu Ser Lys Gln Lys Asp Tyr Glu Glu Ser Ser  
 85 90 95  
 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  
 Leu Glu Glu Ser Pro Asp Asn Asp Gly Phe Leu Lys Ala Pro Cys Arg  
 130 135 140  
 Met Lys Val Ser Ile Pro Thr Lys Ala Leu Glu Leu Met Asp Met Gln  
 145 150 155 160  
 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

ES 2 368 899 T3

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  
 210 215 220  
 Val Ser Gln Lys Asp Val Cys Val Pro Lys Ala Thr His Gln Lys Glu  
 225 230 235 240  
 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  
 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  
 290 295 300  
 Gln Leu Glu Asn Gln Lys Val Lys Trp Glu Gln Glu Leu Cys Ser Val  
 305 310 315 320  
 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  
 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  
 370 375 380  
 His Thr His Glu Asn Glu Asn Tyr Leu Leu His Glu Asn Cys Met Leu  
 385 390 395 400  
 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  
 Lys Glu Lys Asn Ala Glu Leu Gln Met Thr Pro Arg Ala  
 435 440 445

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que comprende al menos una porción de una proteína de tumor de mama, en que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175, o una variante de dicho polipéptido en que la variante comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por una secuencia polinucleotídica que tiene una identidad de al menos 90% con respecto a una secuencia de ID. SEC. nº 175, y la capacidad de la variante para reaccionar con antisueros antigénicamente específicos está potenciada, inalterada o disminuida en menos de un 50% con respecto a la de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la ID. SEC. nº 175; con tal de que el polipéptido no tenga la secuencia expuesta en la ID. SEC. nº 176 con la sustitución de Val Ile por Asn Ser en las posiciones 316 y 317.
- 15 2. Un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el polipéptido es un polipéptido variante que comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 90% con respecto a la secuencia de ID. SEC. nº 175, y la capacidad de la variante para reaccionar con antisueros antigénicamente específicos está disminuida en menos de un 20% con respecto a la de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la ID. SEC. nº 175.
- 20 3. Un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175.
- 25 4. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de ID. SEC. nº 176.
- 30 5. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1.
- 35 6. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína de tumor de mama, en que la proteína tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por un polinucleótido que comprende la secuencia expuesta en la ID. SEC. nº 175.
- 40 7. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia expuesta en la ID. SEC. nº 175.
- 45 8. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos 90% con respecto a la secuencia expuesta en la ID. SEC. nº 175, y que codifica un polipéptido que tiene una capacidad para reaccionar con antisueros antigénicamente específicos que está potenciada, inalterada o disminuida en menos de un 50% con respecto a la de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la ID. SEC. nº 175.
- 50 9. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la Reivindicación 8, en que el polipéptido codificado por ese polinucleótido tiene una capacidad para reaccionar con antisueros antigénicamente específicos que está disminuida en menos de un 20% con respecto a la de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la ID. SEC. nº 175.
- 55 10. Un polinucleótido aislado, complementario de un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 5-9.
- 60 11. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 5-9.
- 65 12. Una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 11.
13. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la Reivindicación 10.
14. Una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 13.
15. Una vacuna que comprende un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1, en combinación con un agente inmunoestimulante.
16. Una vacuna que comprende un polinucleótido de acuerdo con la Reivindicación 5, en combinación con un agente inmunoestimulante.
17. Un anticuerpo aislado, o un fragmento ligante de antígenos del mismo, que se une específicamente a la porción de una proteína de tumor de mama que comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175.

18. Una vacuna que comprende una célula presentadora de antígenos que expresa un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1, en combinación con un agente inmunoestimulante.
- 5 19. Una vacuna de acuerdo con la Reivindicación 18, en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.
20. Un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1, para uso en un método para inhibir el desarrollo de un cáncer de mama en un paciente.
- 10 21. Un polinucleótido de acuerdo con la Reivindicación 5, para uso en un método para inhibir el desarrollo de un cáncer de mama en un paciente.
22. Un anticuerpo o fragmento ligante de antígenos del mismo de la Reivindicación 17, para uso en un método para inhibir el desarrollo de un cáncer de mama en un paciente.
- 15 23. Una célula presentadora de antígenos que expresa un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1, para uso en un método para inhibir el desarrollo de un cáncer de mama en un paciente.
- 20 24. Una célula de acuerdo con la Reivindicación 23, en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.
- 25 25. Una proteína de fusión que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1.
26. Una proteína de fusión de acuerdo con la Reivindicación 25, en que la proteína de fusión comprende un potenciador de expresión que aumenta la expresión de la proteína de fusión en una célula huésped transfectada con un polinucleótido que codifica la proteína de fusión.
- 30 27. Una proteína de fusión de acuerdo con la Reivindicación 26, en que la proteína de fusión comprende un epítipo T cooperador que no está presente en el polipéptido de la Reivindicación 1.
- 35 28. Una proteína de fusión de acuerdo con la Reivindicación 26, en que la proteína de fusión comprende una etiqueta de afinidad.
- 36 29. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína de fusión de acuerdo con la Reivindicación 25.
- 40 30. Una vacuna que comprende una proteína de fusión de acuerdo con la Reivindicación 25, en combinación con un agente inmunoestimulante.
- 45 31. Una vacuna que comprende un polinucleótido de acuerdo con la Reivindicación 29, en combinación con un agente inmunoestimulante.
- 50 32. Una vacuna de acuerdo con la Reivindicación 15, 16, 18, 30 o 31, en que el agente inmunoestimulante es un adyuvante.
- 55 33. Una vacuna de acuerdo con la Reivindicación 15, 16, 18, 30 o 31, en que el agente inmunoestimulante provoca una respuesta predominantemente de Tipo I.
- 60 34. Una vacuna de acuerdo con la Reivindicación 30 o la Reivindicación 31, para uso en un método para inhibir el desarrollo de un cáncer de mama en un paciente.
- 65 35. Un método para eliminar células tumorales de una muestra biológica, que comprende poner la muestra biológica en contacto con células T que reaccionan específicamente con una proteína de tumor de mama, en que la proteína tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175, en que la operación de puesta en contacto es llevada a cabo bajo unas condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la eliminación de las células que expresan el antígeno, de la muestra.
36. Un método de acuerdo con la Reivindicación 35, en que la muestra biológica es sangre o una fracción de la misma.
37. Un método para estimular y/o multiplicar células T específicas para una proteína de tumor de mama, llevado a cabo *ex vivo*, que comprende poner células T en contacto con uno o más de:
- (i) un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1;

- (ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido; y/o
  - (iii) una célula presentadora de antígenos que expresa dicho polipéptido;
- 5        bajo unas condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la estimulación y/o multiplicación de las células T.
- 10        38. Una población aislada de células T específica para una proteína de tumor de mama de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende células T obtenibles de acuerdo con el método de la Reivindicación 37.
- 15        39. Una población de células T de acuerdo con la Reivindicación 38, para uso en un método para inhibir el desarrollo de un cáncer de mama en un paciente.
- 20        40. Células T CD4+ y/o CD8+ proliferadas, aisladas de un paciente con al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1;
  - (ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido; o
  - (iii) una célula presentadora de antígenos que expresa dicho polipéptido;
- 25        e incubadas de modo que las células T proliferen para uso en un método para inhibir el desarrollo de un cáncer de mama en un paciente.
- 30        41. Células T de acuerdo con la Reivindicación 40 para uso en un método para inhibir el desarrollo de un cáncer en un paciente, que comprende las operaciones de:
- (a) clonar al menos una célula proliferada; y
  - (b) administrar al paciente una cantidad eficaz de las células T clonadas, e inhibir por ello el desarrollo de un cáncer de mama en el paciente.
- 35        42. Un método para determinar la presencia o ausencia de un cáncer de mama en un paciente, que comprende las operaciones de:
- (a) poner una muestra biológica obtenida del paciente en contacto con un anticuerpo, o un fragmento ligante de antígenos del mismo, que se une específicamente a la porción, de una proteína de tumor de mama, que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175; y
  - (b) detectar en la muestra una cantidad de un polipéptido que se une específicamente al anticuerpo y/o al fragmento ligante de antígenos del mismo, comparar la cantidad de polipéptido con un valor de corte predeterminado y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer de mama en el paciente.
- 45        43. Un método para controlar el progreso de un cáncer de mama en un paciente, que comprende las operaciones de:
- (a) poner una muestra biológica que se obtiene del paciente en un primer punto temporal en contacto con un anticuerpo, o un fragmento ligante de antígenos del mismo, que se une específicamente a la porción, de una proteína de tumor de mama, que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175;
  - (b) detectar en la muestra una cantidad de un polipéptido que se une específicamente al anticuerpo o al fragmento ligante de antígenos del mismo;
  - (c) repetir las operaciones (a) y (b) usando una muestra biológica obtenida del paciente en un punto temporal posterior; y
  - (d) comparar la cantidad de polipéptido detectada en la operación (c) con la cantidad detectada en la operación (b) y controlar, a partir de la comparación, el progreso del cáncer de mama en el paciente.
- 60        44. Un método de acuerdo con la Reivindicación 42 ó 43, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 65        45. Un método para determinar la presencia o ausencia de un cáncer de mama en un paciente, que comprende las

operaciones de:

- 5 (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, en que la proteína tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175;
- 10 (b) detectar en la muestra una cantidad de un polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido; y
- (c) comparar la cantidad de polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido, con un valor de corte predeterminado y determinar, a partir de la comparación, la presencia o ausencia de un cáncer de mama en el paciente.
- 15 46. Un método para controlar el progreso de un cáncer de mama en un paciente, que comprende las operaciones de:
- 20 (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, en que la proteína tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175;
- 25 (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 punto temporal 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 de mama en el paciente.
- 30 47. Un método de acuerdo con la Reivindicación 45 ó 46, en que la cantidad del polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido se determina utilizando una reacción en cadena de la polimerasa.
- 35 48. Un método de acuerdo con la Reivindicación 45 ó 46, en que la cantidad del polinucleótido que se hibrida con el oligonucleótido se determina usando un ensayo de hibridación.
49. Un kit diagnóstico que comprende:
- (a) uno o más anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 17; y
- 40 (b) un reactivo de detección que comprende un grupo informador.
50. Un kit de acuerdo con la Reivindicación 49, en que los anticuerpos están inmovilizados sobre un soporte sólido.
- 45 51. Un kit de acuerdo con la Reivindicación 50, en que el soporte sólido comprende nitrocelulosa, látex o un material plástico.
52. Un kit de acuerdo con la Reivindicación 49, en que el reactivo de detección comprende una antiinmunoglobulina, proteína G, proteína A o lectina.
- 50 53. Un kit de acuerdo con la Reivindicación 49, en que el grupo informador es seleccionado del grupo que consiste en radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, enzimas, biotina y partículas colorantes.
- 55 54. Un oligonucleótido que comprende de 10 a 40 nucleótidos contiguos de un polinucleótido que codifica una proteína de tumor de mama, en que la proteína tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por la secuencia polinucleotídica expuesta en la ID. SEC. nº 175.
- 55 55. Un oligonucleótido de acuerdo con la Reivindicación 54, en que el oligonucleótido comprende 10-40 nucleótidos contiguos expuestos en la ID. SEC. nº 175.
- 60 56. Un kit diagnóstico que comprende:
- (a) un oligonucleótido de acuerdo con la Reivindicación 54; y
- (b) un reactivo diagnóstico para uso en una reacción en cadena de la polimerasa o un ensayo de hibridación.