

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 706**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/44** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2012 PCT/JP2012/062749**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12157736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2012 E 12786721 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2711015**

54 Título: **Agente inductor de inmunidad**

30 Prioridad:

**19.05.2011 JP 2011112210**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.11.2016**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)  
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo, 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**KURIHARA, AKIRA y  
OKANO, FUMIYOSHI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 589 706 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

Agente inductor de inmunidad

**Campo de la técnica**

5 La presente invención se refiere a un nuevo agente inductor de la inmunidad útil como agente terapéutico y/o profiláctico.

**Técnica anterior**

10 El cáncer es la causa más frecuente de muerte entre todas las causas de muerte y los tratamientos que se llevan a cabo para el mismo en la actualidad son, principalmente, tratamientos quirúrgicos, que se pueden realizar en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. A pesar del desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas y el descubrimiento de nuevos agentes anticancerosos de los últimos años, los resultados del tratamiento del cáncer  
15 siguen sin haber mejorado, excepto en los casos de algunos tipos de cáncer. En los últimos años, en virtud del desarrollo de la biología molecular y la inmunología del cáncer se han identificado antígenos del cáncer reconocidos por linfocitos T citotóxicos que son reactivos para el cáncer, así como los genes que codifican, y han aumentado las expectativas para la inmunoterapia específica del antígeno.

20 En la inmunoterapia, con el fin de reducir los efectos secundarios, la presencia del péptido o proteína que es reconocida como el antígeno apenas es necesaria en las células normales y debe estar presente específicamente en las células de cáncer. En 1991, Boon et al. del Ludwig Institute en Bélgica, aislaron un antígeno de melanoma humano, MAGE1, que es reconocido por los linfocitos T positivos para CD8, a través de un método de clonación de la expresión de ADNc usando una línea celular de cáncer autóloga y linfocitos T reactivos al cáncer (documento no  
25 patente 1). Después, se informó sobre el método SEREX (identificaciones serológicas de antígenos por clonación de expresión recombinante), que identifica antígenos tumorales reconocidos por los anticuerpos producidos en el cuerpo vivo de un paciente con cáncer en respuesta al propio cáncer del paciente mediante la aplicación de un método clonación de la expresión génica (Documento de patente 1, documento no patente 2) y diversos antígenos del cáncer se han aislado mediante este método. Las pruebas clínicas de la inmunoterapia del cáncer usando  
30 algunos de estos antígenos como dianas se han iniciado.

Por otro lado, como en el caso de los seres humanos, se conocen varios tumores, tales como el cáncer de la glándula mamaria y el carcinoma de células escamosas, en perros y gatos, y están en los puestos más altos en las estadísticas de las enfermedades caninas y felinas. Sin embargo, en la actualidad no hay agentes terapéuticos,  
35 profilácticos o de diagnóstico eficaces para el cáncer canino o felino. Dado que la mayoría de los dueños de perros o gatos no notan tumores caninos o felinos hasta que los tumores se han agrandado debido a la progresión, cuando acuden al hospital ya es demasiado tarde e incluso si son sometidos a operación quirúrgica o se administran fármacos para uso humano (por ejemplo, un fármaco antineoplásico o similar), suelen morir poco después del tratamiento. En dichas circunstancias, si se dispone de agentes terapéuticos y profilácticos para el cáncer que sean  
40 eficaces para perros o gatos, cabe esperar que se desarrollen sus usos para el cáncer canino.

Se conoce la esteroil-CoA desaturasa (SCD1) (por ejemplo, véase el documento de patente 2). Introduce un doble enlace en la posición C9-C10 de un ácido graso saturado. Los sustratos preferentes para la enzima son palmitoil-CoA (16:0) y esteroil-CoA (18:0), y estos se convierten a palmitoleoil-CoA (16:1) y oleoil-CoA (18:1),  
45 respectivamente. El ácido graso monoinsaturado obtenido se puede utilizar después in vivo para la preparación de fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol. Además, varios tipos de cáncer, tales como cáncer de hígado, cáncer de esófago y cáncer de colon, muestran un incremento de la expresión de SCD1, y se ha informado de que la inhibición de la función de SCD1 con ARNip o un compuesto de bajo peso molecular provoca la supresión del crecimiento de las células o la inducción de la apoptosis (documentos no patente 3, 4 y 5). El uso terapéutico de  
50 SCD1 no se conoce. El documento de patente 3 describe la administración de SCD1, pero solo en el contexto de la generación o producción de anticuerpos frente a la enzima. No hay ningún informe que sugiera que la proteína SCD1 tiene actividad inductora de inmunidad contra las células cancerosas y, por lo tanto, que la proteína es útil para el tratamiento o profilaxis del cáncer.

**Documentos de la técnica anterior**

Documento de patente

[Documento patente 1] US 5698396 B  
60 [Documento patente 2] WO02/074786  
[Documento patente 3] JP2003 533965

Documentos no patente

65 [Documento no patente 1] Bruggen P. et al., Science, 254:1643–1647 (1991)  
[Documento no patente 2] Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11810–11813 (1995)

- [Documento no patente 3] Scaglia N. et al., PLoS One 4: e6812 (2009)  
 [Documento no patente 4] Morgan-Lappe SE. et al., Cancer Res 67: 4390–4398 (2007)  
 [Documento no patente 5] Scaglia N. et al., Biochim Biophys Acta 1687: 141–151 (2005)  
 [Documento no patente 6] Ariyama H. et al., J Biol Chem (2010)

5

## Sumario de la invención

### Problemas que ha de resolver la invención

- 10 Es un objetivo de la presente invención descubrir un nuevo polipéptido útil para un agente terapéutico y/o profiláctico para el cáncer y proporcionar el polipéptido para su uso como agente inductor de inmunidad.

### Medios para resolver los problemas

- 15 Los presentes inventores han realizado estudios intensivos mediante el método SEREX usando una biblioteca de ADNc derivado de tejido testicular canino y suero obtenido de un perro portador de tumores, para obtener un ADNc que codifica una proteína que se une a los anticuerpos presentes en el suero obtenido de un cuerpo vivo portador de tumores y con el ADNc se preparó un polipéptido de la esteroil-CoA desaturasa 1 canina (en lo sucesivo en el presente documento denominada SCD1) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.
- 20 Adicionalmente, basándose en genes homólogos humanos y de ratón del gen obtenido se prepararon SCD1 humanas y de ratón con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4 y 6 Adicionalmente, los presentes inventores descubrieron que estos polipéptidos SCD1 se expresaban específicamente en tejidos o células de cáncer de mama, tumor cerebral, cáncer de colon, adenocarcinoma perianal, mastocitoma, neuroblastoma, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y leucemia. Los presentes inventores descubrieron además
- 25 que la administración de SCD1 a un cuerpo vivo permite la inducción de inmunocitos contra SCD1 en el cuerpo vivo y la regresión de un tumor que expresa SCD1 en el cuerpo vivo. Además, los presentes inventores descubrieron que un vector recombinante que puede expresar un polinucleótido que codifica el polipéptido de SCD1 o un fragmento del mismo induce un efecto antitumoral contra el cáncer que expresa SCD1 en un cuerpo vivo.
- 30 Además, los presentes inventores descubrieron que un polipéptido SCD1 tiene la capacidad de ser presentado por las células presentadoras de antígeno para producir la activación y el crecimiento de los linfocitos T citotóxicos específicos del péptido (actividad inductora de inmunidad) y, por lo tanto, que el polipéptido es útil para terapia y/o profilaxis del cáncer. Además, los presentes inventores descubrieron que las células presentadoras de antígeno que se han puesto en contacto con el polipéptido, y los linfocitos T que han entrado en contacto con las células
- 35 presentadoras de antígeno, son útiles para la terapia y/o profilaxis del cáncer, completando de este modo la presente invención.

Por tanto, la presente invención tiene las características siguientes.

- 40 (1) Un agente inductor de inmunidad para su uso en un método de tratamiento médico o veterinario, comprendiendo el agente inductor de inmunidad, como principio o principios activos eficaces, al menos un polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad seleccionado de los polipéptidos (a) y (b), a continuación:
- 45 (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 2, 22 y 24;  
 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia no inferior al 85 % con el polipéptido (a).
- (2) El agente inductor de inmunidad según (1), en el que el polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 2, 22 o 24 en el LISTADO DE SECUENCIAS.
- 50 (3) El agente inductor de inmunidad para su uso según (1) o (2), en el que el método comprende administrara a un paciente
- (i) el polipéptido,  
 55 (ii) un linfocito T citotóxico que se une selectivamente a un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporado en una molécula de MHC, y/o  
 (iii) una célula presentadora de antígeno que presenta en su superficie un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporados en una molécula de MHC.
- 60 (4) El agente inductor de inmunidad para su uso según uno cualquiera de (1) a (3), que es para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer.
- (5) Un agente inductor de inmunidad para su uso en un método de tratamiento médico o veterinario, comprendiendo el agente inductor de inmunidad como ingrediente o ingredientes eficaces un vector o vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican al menos un polipéptido que
- 65 tiene actividad inductora de inmunidad seleccionada de los polipéptidos (a) y (b) a continuación, siendo dicho vector o vectores capaces de expresar dicho polipéptido o polipéptidos in vivo:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 2, 22 y 24;

(b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia no inferior al 85 % con el polipéptido (a);

5 en el que el agente inductor de inmunidad es para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer.

(6) El agente inductor de inmunidad para su uso según (5), en el que dicho polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 2, 22 o 24.

10 (7) El agente inductor de inmunidad para su uso según (5) o (6), en el que el método comprende administrara a un paciente

(i) el vector,

(ii) un linfocito T citotóxico que se une selectivamente a un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporado en una molécula de MHC, y/o

15 (iii) una célula presentadora de antígeno que presenta en su superficie un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporados en una molécula de MHC.

(8) El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con uno cualquiera de (4) a (7), en el que dicho cáncer o cánceres son cánceres que expresan SCD1.

20 (9) El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con uno cualquiera de (4) a (8), en el que dicho cáncer o cánceres son cáncer de mama, tumor cerebral, cáncer de colon, adenocarcinoma perianal, neuroblastoma, mastocitoma, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y/o leucemia.

25 (10) El agente inductor de inmunidad para su uso según uno cualquiera de (1) a (9), que comprende además un agente potenciador inmunitario.

(11) El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con (10), en el que dicho agente potenciador inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en adyuvante incompleto de Freund, Montanide, poli-I:C y derivados de los mismo, oligonucleótidos CpG, interleucina -12, interleucina -18, interferón - $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\omega$ , interferón- $\gamma$  y ligando de Flt3.

30 (12) Un método *in vitro* para preparar una célula presentadora de antígeno que presenta en su superficie un complejo que comprende al menos un polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad derivada de los polipéptidos (a) y (b) a continuación incorporado a una molécula de MHC, comprendiendo el método poner en contacto la célula presentadora de antígeno con dicho al menos un polipéptido seleccionado de:

35 (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 2, 22 o 24; y  
(b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia no inferior al 85 % con el polipéptido (a).

40 (13) Un método *in vitro* para preparar un linfocito T citotóxico que se une de forma selectiva a un complejo que comprende al menos un polipéptido (a) o (b) de acuerdo con (12) incorporado en una molécula de MHC, comprendiendo el procedimiento:

45 cocultivar una célula presentadora de antígeno preparada de acuerdo con el método de (12) con al menos un linfocito T, y

permitir que el al menos un linfocito T proliferen.

(14) -Un método *in vitro* de acuerdo con (13) en el que se usa la proporción de célula presentadora de antígeno:linfocitos T de 1:1 a 1:100 se utiliza, opcionalmente en el que el cocultivo se lleva a cabo en presencia de IL-2, IL-6, IL -7 y/o IL-12.

## 50 Efecto de la invención

La presente invención proporciona un nuevo agente inductor de inmunidad útil para el tratamiento, profilaxis y/o similar del cáncer. Como se describe específicamente en los ejemplos que se mencionan más adelante, la administración del polipéptido usado en la presente invención a un cuerpo humano permite la inducción de  
55 inmunocitos en el cuerpo vivo y un cáncer que ya se ha producido se puede reducir o remitir. Por tanto, el polipéptido es útil para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer.

### Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 muestra los patrones de expresión del gen de SCD1 identificado tejidos normales, tejidos tumorales y líneas celulares tumorales de perro. El número de referencia 1 representa los patrones de expresión del gen de SCD1 de perro en varios tejidos y líneas celulares de perro, el número de referencia 2, los patrones de expresión del gen de GAPDH de perro en varios tejidos y líneas celulares de perro.

65 La figura 2 muestra los patrones de expresión del gen de SCD1 identificado tejidos normales, tejidos tumorales y líneas celulares tumorales de ser humano. El número de referencia 3 representa los patrones de expresión del gen de SCD1 de ser humano en varios tejidos y líneas celulares de ser humano, el número de referencia 4, los

patrones de expresión del gen de GAPDH de perro en varios tejidos y líneas celulares de ser humano.

La figura 3 muestra los patrones de expresión del gen de SCD1 identificado tejidos normales, tejidos tumorales y líneas celulares tumorales de ratón. El número de referencia 5 representa los patrones de expresión del gen de SCD1 de ratón en varios tejidos y líneas celulares de ratón, el número de referencia 6, los patrones de expresión del gen de GAPDH de perro en varios tejidos y líneas celulares de ratón.

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

Entre los ejemplos del polipéptido contenido en el agente inductor de inmunidad de la presente invención como principio activo incluyen los siguientes: En la presente invención, el término "polipéptido" significa una molécula formada por una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos e incluye no solo moléculas de polipéptido constituidos por un gran número de aminoácidos sino también moléculas de bajo peso molecular constituidas por un número pequeño de aminoácidos (oligopéptidos) y proteínas de longitud completa. La presente descripción también incluye la proteína SCD1 de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 2, 22 o 24.

(a) Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 2, 22 o 24 en el LISTADO DE SECUENCIAS, y tiene actividad inductora de inmunidad.

(b) Un polipéptido que tiene una identidad de secuencia no inferior al 85 % con el polipéptido (a) y actividad inductora de inmunidad.

En el presente documento se describe (c) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a) o (b) como una secuencia parcial del mismo y tiene actividad inductora de inmunidad.

En la presente invención, la expresión "que tiene una secuencia de aminoácidos" significa que los restos de aminoácidos están dispuestos en dicho orden. Por tanto, por ejemplo, "polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 2" significa el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de Met Pro Ala His... (snip)... Tyr Lys Ser Gly mostrada en la SEQ ID NO: 2, cuyo polipéptido tiene un tamaño de 360 restos de aminoácidos. Adicionalmente, por ejemplo, "polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2" puede denominarse "polipéptido de SEQ ID NO: 2" para abreviar. Lo mismo se aplica a la expresión "que tiene la secuencia de bases". En este contexto, el término "que tiene" se puede reemplazar por la expresión "compuesto por".

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "actividad de inductora de inmunidad" significa la capacidad para inducir inmunocitos que secretan citocinas, tales como interferón en un cuerpo vivo.

Que el polipéptido tenga o no actividad inductora de inmunidad puede confirmarse usando, por ejemplo, el ensayo de ELISPOT conocido. Más específicamente, por ejemplo, como se describe en los ejemplos siguientes, las células tales como las células mononucleares de sangre periférica se obtienen de un cuerpo vivo al que se ha administrado el polipéptido cuya actividad inductora de inmunidad se va a evaluar y las células obtenidas se cocultivaron con el polipéptido, seguido de la determinación de la cantidad o cantidades de una o más citocinas producidas por las células usando un anticuerpo/anticuerpos específicos, de modo que se permite la determinación del número de inmunocitos entre las células. Esto permite la evaluación de la actividad inductora de inmunidad.

Como alternativa, como se describe en los ejemplos mencionados más adelante, la administración del polipéptido recombinante de cualquiera de (a) a (c) descritos anteriormente a un animal portador de tumor permite la regresión del tumor por su actividad inductora de inmunidad. Por lo tanto, la actividad inductora de inmunidad anterior puede evaluarse también como la capacidad para suprimir el crecimiento de las células cancerosas o causar la reducción o desaparición de un tejido de cáncer (tumor) (en lo sucesivo denominado "actividad antitumoral"). La actividad antitumoral de un polipéptido puede confirmarse mediante, por ejemplo, como se describe más específicamente en los ejemplos más adelante, la observación de si un tumor disminuye de tamaño o no cuando el polipéptido se administró realmente a un cuerpo vivo portador de cáncer.

Como alternativa, la actividad antitumoral de un polipéptido puede evaluarse también mediante observación de si los linfocitos T estimulados por el polipéptido (es decir, los linfocitos T puestos en contacto con las células presentadoras de antígeno que presentan el polipéptido) exhiben o no actividad citotóxica sobre las células tumorales *in vitro*. Los linfocitos T se pueden poner en contacto con las células presentadoras de antígeno a través de su cocultivo en un medio líquido, como menciona a continuación. La actividad citotóxica se puede medir mediante, por ejemplo, el método conocido a la que se denomina ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr descrito en Int. J. Cancer, 58: pág. 317, 1994. En los casos en los que el polipéptido se va a usar para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, la evaluación de la actividad inductora de inmunidad se lleva a cabo, preferentemente, utilizando la actividad antitumoral como un indicador, aunque el índice no está particularmente limitado.

Cada una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 22 y 24 enumeradas en el LISTADO DE SECUENCIAS divulgado en la presente invención es una secuencias de aminoácidos de SCD1 que se aisló mediante el método SEREX usando una biblioteca de ADNc derivado de tejido testicular canino normal y suero de

un perro portador de tumor, como polipéptido que se une específicamente a un anticuerpo existente en el suero de un perro portador de un tumor, o un factor homólogo del polipéptido en seres humanos, vacas o caballos (véase el Ejemplo 1). La SCD1 humana, que es el factor homólogo humano de la SCD1 de perro, tiene una identidad de secuencia del 89 % en términos de la secuencia de bases y del 90 % en términos de la secuencia de aminoácidos; la SCD1 bovina, que es el factor homólogo bovino, tiene una identidad de secuencia del 88 % en términos de la secuencia de bases y del 87 % en términos de la secuencia de aminoácidos; y la SCD1 equina, que es el factor homólogo equino, tiene una identidad de secuencia del 90% en términos de la secuencia de bases y del 87 % en términos de la secuencia de aminoácidos.

El polipéptido (a) es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4, 22 o 24, y tiene actividad inductora de inmunidad. Más preferentemente, el polipéptido es un polipéptido compuesto por una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia no inferior al 85 % con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y, especialmente preferentemente, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 4, 22 o 24. Como se sabe en la técnica, un polipéptido que tiene al menos siete restos de aminoácidos puede ejercer su antigenicidad e inmunogenicidad. En consecuencia, también se describe en el presente documento un polipéptido que tiene al menos siete restos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 4, 22 o 24 puede tener actividad inductora de inmunidad, de modo que el polipéptido se puede usar para la preparación del agente inductor de inmunidad.

Como el principio de inducción de inmunidad a través de la administración de un polipéptido antigénico de cáncer, se conoce el siguiente proceso: un polipéptido se incorpora en una célula presentadora de antígeno y después es degradado en fragmentos más pequeños por las peptidasas de la célula, seguido de presentarse en la superficie de la célula. A continuación, los fragmentos son reconocidos por un linfocito T citotóxico o similares que destruye selectivamente las células presentadoras de antígeno. El tamaño de un polipéptido presentado sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno es relativamente pequeño y es aproximadamente de 7 a 30 aminoácidos. Por tanto, desde el punto de vista de la presentación del polipéptido sobre la célula presentadora de antígeno, un modo preferido del polipéptido descrito anteriormente (a) es un polipéptido compuesto por aproximadamente de 7 a 30 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 4, 22 o 24 y, más preferentemente, un polipéptido compuesto por de aproximadamente 8 a 30 o de aproximadamente 9 a 30 aminoácidos es suficiente como el polipéptido (a). En algunos casos, estos polipéptidos de un tamaño relativamente pequeño se presentan directamente sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno sin incorporarse en las células presentadoras de antígeno.

Adicionalmente, un polipéptido incorporado en una célula presentadora de antígeno se escinde en posiciones aleatorias con las peptidasas presentes en la célula, para dar varios fragmentos polipeptídicos, que se presentan sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno. Por tanto, la administración de un polipéptido grande, tal como la región de longitud completa de las SEQ ID NO: 2, 4, 22 o 24 causa, inevitablemente, la producción de fragmentos polipeptídicos mediante la degradación en la célula presentadora de antígeno, fragmentos que son eficaces para la inducción de inmunidad a través de la célula presentadora de antígeno. Por lo tanto, también para la inducción de inmunidad a través de las células presentadoras de antígeno, preferentemente se puede usar un polipéptido de gran tamaño el polipéptido puede estar compuesto por al menos 30, preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 200, aún más preferentemente al menos 250 aminoácidos. El polipéptido puede estar compuesto, aún más preferentemente, por la región de longitud completa de las SEQ ID NO: 2, 4, 22 o 24.

El polipéptido (b) es el mismo polipéptido que el polipéptido (a) excepto que un pequeño número de (preferentemente, uno o varios) restos de aminoácidos están sustituidos, deletados y/o insertados, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 %, aún más preferentemente al menos el 99 % o a menos el 99,5 % con la secuencia original y tiene una actividad inductora de inmunidad. En la técnica se sabe, en general, que hay casos en los que un antígeno proteico retiene casi la misma antigenicidad que la de la proteína original, incluso si la secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica de tal manera que un pequeño número de restos de aminoácidos se han sustituido, eliminado y/o se insertado. Por lo tanto, dado que el polipéptido (b) puede también ejercer una actividad inductora de inmunidad, se puede usar para la preparación del agente inductor de inmunidad de la presente invención. Además, el polipéptido (b) es, también preferentemente, un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 4, 22 o 24, excepto que uno o varios restos de aminoácidos de han sustituido, deletado y/o insertado. Tal como se usa en el presente documento, el término "varios" dignifica un número entero de 2 a 10, preferentemente un número entero de 2 a 6, más preferentemente un número entero de 2 a 4.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia" de las secuencias de aminoácidos o las secuencia de bases significa el valor calculado mediante alineación de dos secuencias de aminoácidos (o secuencias de bases) para su comparación de modo que el número de restos de aminoácidos (o bases) coincidentes es máximo entre las secuencias de aminoácidos (o secuencias de bases) y dividiendo el número de restos de aminoácidos coincidentes (o el número bases emparejadas) por el número total de restos de aminoácidos (o el número total de bases), cuyo valor está representado como un porcentaje. Cuando se alinean las secuencias

se insertan uno o más huecos en una o las dos secuencias que se van a comparar, según sea necesario. Tal alineación de secuencias puede llevarse a cabo con el uso de un programa bien conocido, tal como BLAST, FASTA, o CLUSTAL W. Cuando se insertan uno o más huecos, el número total de restos de aminoácidos descrito anteriormente es el número de restos calculados contando un hueco como un resto de aminoácido. Cuando el

5 número total de restos de aminoácidos contado difiere entre las dos secuencias que se van a comparar, la identidad de la secuencia (%) se calcula dividiendo el número de los restos de aminoácidos coincidentes por el número total de restos de aminoácidos en la secuencia más larga.

Los 20 tipos de aminoácidos que constituyen proteínas de origen natural se pueden clasificar en grupos en cada uno de los cuales se comparten propiedades similares, por ejemplo, en aminoácidos neutros con cadenas laterales que tienen una polaridad baja (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro), aminoácidos neutros que tienen cadenas laterales hidrófilas (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys), aminoácidos ácidos (Asp, Glu), aminoácidos básicos (Arg, Lys, His) y aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp). Se sabe que, en muchos casos, la sustitución de un aminoácido dentro del mismo grupo no cambia las propiedades del polipéptido. Por tanto, en los casos en los que un resto de aminoácidos en el polipéptido (a) de la presente invención está sustituido, la probabilidad de que se pueda mantener la actividad inductora de inmunidad puede aumentarse realizando la sustitución dentro del mismo grupo, que es preferente.

10

15

En el presente documento también se describe el polipéptido (c), que es un polipéptido que comprende el polipéptido de (a) o (b) como una secuencia parcial y tiene actividad inductora de inmunidad. Es decir, el polipéptido (c) es un polipéptido en el que uno o más aminoácidos y/o uno o más polipéptidos se añaden en uno o ambos extremos del polipéptido (a) o (b), y tiene actividad inductora de inmunidad. Tal polipéptido se puede utilizar también para preparar el agente inductor de inmunidad.

20

Los polipéptidos descritos anteriormente se pueden sintetizar mediante, por ejemplo, un método de síntesis química, tal como el método de Fmoc (método de fluorenilmetiloxycarbonilo) o el método de tBoc (método de t-butiloxycarbonilo). Además, pueden sintetizarse mediante métodos convencionales usando diversos tipos de sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente. Además, el polipéptido de interés se puede obtener usando técnicas de ingeniería genética conocidas mediante la preparación de un polinucleótido que codifica el polipéptido y la incorporación del polinucleótido en un vector de expresión, seguido de la introducción del vector resultante en una célula huésped y permitiendo que la célula huésped produzca el polipéptido en ella.

25

30

El polinucleótido que codifica el polipéptido anterior se puede preparar fácilmente a través de una técnica de ingeniería genética conocida o método convencional usando un sintetizador de ácidos nucleicos disponible comercialmente. Por ejemplo, el ADN que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1 se puede preparar mediante la realización de PCR con el uso de ADN cromosómico o una biblioteca de ADNc como molde y un par de cebadores diseñados de forma que la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1 se puede amplificar con ellos. El ADN que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3 se puede preparar de manera similar mediante el uso de un ADN cromosómico humano o una biblioteca de ADNc como molde. Las condiciones de reacción para la PCR se pueden ajustar apropiadamente y los ejemplos de las condiciones de reacción incluyen, pero no se limitan a las mismas, repitiendo el proceso de reacción de 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante de 30 segundos a 1 minuto (hibridación) y 72 °C durante 2 minutos (extensión) para, por ejemplo, 30 ciclos, seguidos de la reacción a 72 °C durante 7 minutos. Adicionalmente, el ADN deseado se puede aislar mediante la preparación de una sonda o cebador adecuado en función de la información de la secuencia de bases o la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 3 en el LISTADO DE SECUENCIAS en la presente descripción, y la detección selectiva de una biblioteca de ADNc de perro, ser humano o similares, utilizando la sonda o cebador. La biblioteca de ADNc se prepara, preferentemente, a partir de células, un órgano o un tejido que expresa la proteína de las SEQ ID NO: 2 o 4. Las operaciones descritas anteriormente, tales como la preparación de la sonda o cebador, la construcción de la biblioteca de ADNc, la detección selectiva de la biblioteca de ADNc y la clonación del gen de interés son conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden llevar a cabo de acuerdo con los métodos descritos en Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology; y/o similares. A partir del ADN obtenido de este modo, se puede obtener el ADN que codifica el polipéptido (a). Adicionalmente, dado que se conocen los codones que codifican cada aminoácido, la secuencia de bases de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos específica puede identificarse fácilmente. Por lo tanto, ya que la secuencia de bases de un polinucleótido que codifica el polipéptido (b) o el polipéptido (c) también se puede especificar fácilmente, un polinucleótido de este tipo también se puede sintetizar fácilmente utilizando un sintetizador de ácidos nucleicos disponible comercialmente de acuerdo con un método convencional.

35

40

45

50

55

Las células huésped no están restringidas, siempre que las células puedan expresar el polipéptido descrito anteriormente y entre los ejemplos de las células se incluyen, entre otras, células procariotas, tales como *E. coli*; y células eucariotas, tales como células cultivadas de mamífero, incluidas células de riñón de mono COS 1 y células de ovario de hámster chino, CHO, la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) y la línea de células de la piel de feto de ratón (NIH3T3), levadura en gemación, levadura en división, células de gusanos de seda, y células de huevos de *Xenopus laevis*.

60

Cuando se usan células huésped procariotas como las células huésped, se usa un vector de expresión que contiene un origen que permite la replicación del vector en una célula procariota, un promotor, un sitio de unión a ribosomas,

65

un sitio de clonación de ADN, un terminador y/o similares. Ejemplos del vector de expresión para *E. coli* incluyen el sistema pUC, pBluescriptII, el sistema de expresión pET, y el sistema de expresión pGEX. Mediante la incorporación de un ADN que codifica el polipéptido anterior en dicho vector de expresión y transformar las células huésped procarionóticas con el vector, seguido de cultivo de los transformantes resultantes, el polipéptido codificado por el ADN se puede expresar en las células huésped procarionóticas. En este caso, dicho polipéptido se puede expresar también en forma de una proteína de fusión con otra proteína.

Cuando se usan células eucariotas como las células huésped, se usa como vector de expresión un vector de expresión para células eucariotas que comprende un promotor, un sitio de corte y empalme, un sitio de adición de poli (A) y/o similares. Ejemplos un vector de expresión de este tipo incluyen los vectores pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, vector del EBV, pRS, pcDNA3, pMSG y pYES2. De un modo similar al caso anterior, mediante la incorporación de un ADN que codifica el polipéptido anterior en dicho vector de expresión y transformando las células huésped eucariotas con el vector, seguido de cultivo de los transformantes resultantes, el polipéptido codificado por el ADN se puede expresar en las células huésped eucariotas. Cuando se usan pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1, pEGFP-C1 o similares como vector de expresión, el polipéptido anterior se puede expresar en forma de una proteína de fusión que comprende un marcador, tal como un marcador de His, marcador FLAG, marcador myc, marcador HA o GFP.

Para la introducción del vector de expresión en las células huésped, se puede usar un método bien conocido tal como la electroporación, el método del fosfato de calcio, el método de liposomas o el método de DEAE dextrano.

El aislamiento y la purificación del polipéptido de interés de las células huésped pueden llevarse a cabo mediante una combinación de operaciones de separación conocidas. Ejemplos de las operaciones de separación conocidas incluyen, pero no se limitan a las mismas, el tratamiento con un agente desnaturante tal como urea, o con un tensoactivo, tratamiento con ultrasonidos, digestión enzimática, desplazamiento salino o precipitación fraccionada con un disolvente, diálisis, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, isoelectroenfoque, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad, y cromatografía de fase inversa.

Los polipéptidos obtenidos mediante los métodos anteriores también incluyen, como se ha mencionado anteriormente, los de la forma de una proteína de fusión con otra proteína arbitraria. Ejemplos de las mismas incluyen proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) o proteínas de fusión con un marcador de His. Tal polipéptido en forma de una proteína de fusión también se describe en el presente documento. Adicionalmente, en algunos casos, el polipéptido expresado en una célula transformada se modifica de varias formas en la célula después de la traducción. Tal polipéptido modificado postraduccionalmente también está incluido dentro del alcance de la presente invención, siempre que tenga actividad inductora de inmunidad. Entre los ejemplos de tal modificación postraduccional se incluyen: eliminación de la metionina en N-terminal, acetilación en N-terminal, glicosilación, degradación limitada con proteasa intracelular, miristoilación, isoprenilación y fosforilación.

Como se describe más específicamente en los ejemplos que se mencionan más adelante, la administración del polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad a un cuerpo vivo portador de un tumor permite la regresión de un tumor ya existente. Por lo tanto, el agente inductor de inmunidad de la presente invención puede usarse como agente terapéutico y/o preventivo para el cáncer. Además, el polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad se puede utilizar para un método de terapia y/o profilaxis del cáncer por inducción inmune.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "tumor" y "cáncer" significan una neoplasia maligna y se utilizan de forma intercambiable.

En este caso, el cáncer que se va a tratar no está restringido, siempre que se exprese la SCD1 en el cáncer y el cáncer es, preferentemente, cáncer de mama, tumor cerebral, cáncer de colon, adenocarcinoma perianal, mastocitoma, neuroblastoma, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o leucemia.

El animal sujeto es, preferentemente, un mamífero, más preferentemente un mamífero tal como un primate, animal de compañía, animal doméstico o un animal para deporte, en especial, preferentemente, un ser humano, perro o gato.

La vía de administración del agente inductor de inmunidad de la presente invención a un cuerpo vivo puede ser administración oral o administración parenteral, y es, preferentemente, la administración parenteral tal como administración intramuscular, administración subcutánea, administración intravenosa o administración intraarterial. En los casos en que se utiliza el agente inductor de inmunidad para el tratamiento del cáncer, se puede administrar a un ganglio linfático regional en la proximidad del tumor que se va a tratar, como se describe en los ejemplos a continuación, con el fin de mejorar su actividad contra el cáncer. La dosis puede ser cualquier dosis, siempre y cuando la dosis sea eficaz para la inducción inmune, y, por ejemplo, en los casos en que se utiliza el agente para terapia y/o profilaxis del cáncer, la dosis puede ser una eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer. La dosis eficaz para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer se selecciona adecuadamente dependiendo del tamaño, los síntomas y similares del tumor, y la dosis eficaz es, generalmente, de 0,0001 µg a 1000 µg, preferentemente de

0,001 µg a 1000 µg por animal sujeto al día. El agente puede administrarse una vez, o dividida en varias veces. El agente se administra, preferentemente, dividido en varias veces, cada varios días a varios meses. Como se muestra concretamente en los ejemplos a continuación, el agente inductor de inmunidad de la presente invención puede causar la regresión de un tumor ya producido. Por lo tanto, puesto que el agente puede ejercer su actividad contra el

5 cáncer también contra un pequeño número de células de cáncer en una etapa temprana, el desarrollo o recurrencia del cáncer se puede prevenir mediante el uso del agente antes del desarrollo de cáncer o después del tratamiento para el cáncer. Es decir, el agente inductor de inmunidad de la presente invención es eficaz tanto para el tratamiento como para la profilaxis del cáncer.

10 El agente inductor de inmunidad de la presente invención puede contener solamente un polipéptido o puede formularse mezclándose según sea apropiado con un aditivo, tal como un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para cada modo de administración. Los métodos y aditivos de formulación que pueden usarse son bien conocidos en el campo de la formulación de productos farmacéuticos y se puede usar cualquiera de los métodos y aditivos. Ejemplos específicos de los aditivos incluyen, sin limitaciones a los mismos,

15 diluyentes, tales como soluciones fisiológicas tampón; vehículos, tales como azúcar, lactosa, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol y glicina; aglutinantes, tales como jarabe, gelatina, goma arábica, sorbitol, cloruro de polivinilo, y tragacanto; y lubricantes, tales como estearato de magnesio, polietilenglicol, talco, y sílice. Ejemplos de la formulación incluyen preparados orales, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, y jarabe, y preparados parenterales, tales como inhaladores, preparados para inyección, supositorios, y soluciones. Estas

20 formulaciones se pueden preparar mediante métodos de producción conocidos habitualmente.

El agente inductor de inmunidad de la presente invención se puede usar en combinación con un potenciador inmunológico capaz de aumentar la respuesta inmunitaria en un cuerpo vivo. El potenciador inmunológico puede estar contenido en el agente inductor de inmunidad de la presente invención o administrarse como una composición separada a un paciente en combinación con el agente inductor de inmunidad de la presente invención.

25

Entre los ejemplos del potenciador inmunológico se incluyen adyuvantes. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmunitaria proporcionando un reservorio de antígeno (extracelularmente o dentro de macrófagos), activando macrófagos y estimulando conjuntos específicos de linfocitos, mejorando así la respuesta inmunitaria y, por lo tanto, la acción contra el cáncer. Por lo tanto, especialmente en los casos en que el agente inductor de inmunidad de la presente invención se usa para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, el agente inductor de inmunidad comprende, preferentemente, un adyuvante, además del polipéptido anteriormente descrito anteriormente como ingrediente eficaz. En la técnica se conocen bien muchos tipos de adyuvantes y se puede usar cualquiera de estos adyuvantes. Ejemplos específicos de MPL incluyen (SmithKline Beecham), homólogos del lipopolisacárido Re 595 de *Salmonella minnesota* obtenido por purificación e hidrólisis ácida del lipopolisacárido; QS21 (SmithKline Beecham), saponina QA-21 pura purificada a partir de un extracto de *Quillja saponaria*; DQS21 descrito en la solicitud PCT WO 96/33739 (SmithKline Beecham); QS-7, QS-17, QS-18 y QS-L1 (So y 10 colaboradores, "Molecules and cells", 1997, Vol. 7, p. 178-186); adyuvante incompleto de Freund; adyuvante completo de Freund; vitamina E; Montanide; alumbre; oligonucleótido CpG (véase, por ejemplo, Kreig y 7 colaboradores, Nature, Vol. 374, pág. 546-549); poi-I:C y derivado del mismo (por ejemplo, poli ICLC); y diversas emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites biodegradables, tales como escualeno y/o tocoferol. Entre éstos, se prefieren adyuvante incompleto de Freund; Montanide; poli-I: C y derivados del mismo; y oligonucleótidos CpG. La relación de mezcla entre el adyuvante descrito anteriormente y el polipéptido es normalmente de aproximadamente 1:10 a 10:1, preferentemente de aproximadamente 1:5 a 5:1, más preferentemente de aproximadamente 1:1. Sin embargo,

30

35

40

45

50 el adyuvante no se limita a los ejemplos descritos anteriormente y también se pueden utilizar adyuvantes conocidos en la técnica distintos de los descritos anteriormente cuando se administra el agente inductor de inmunidad de la presente invención (véase, por ejemplo, Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª edición", 1986). Métodos de preparación de mezclas o emulsiones de un polipéptido y un adyuvante son bien conocidos por los expertos en la técnica de la vacunación.

Adicionalmente, además de los adyuvantes descritos anteriormente, los factores que estimulan la respuesta inmunitaria del sujeto se pueden utilizar como el potenciador inmunitario descrito anteriormente. Por ejemplo, se pueden usar diversas citocinas que tienen una propiedad para estimular linfocitos y/o células presentadoras de antígeno como potenciador inmunitario en combinación con el agente inductor de inmunidad de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen un número de tales citocinas capaces de potenciar la respuesta inmunitaria y entre los ejemplos de las citocinas se incluyen, pero no se limitan a las mismas, interleucina-12 (IL-12), GM-CSF, IL-18, interferón-α, el interferón-β, interferón-ω, interferón-ω y el ligando de Flt3, que se ha demostrado que potencian la acción profiláctica de las vacunas. Tales factores también pueden usarse como el potenciador inmunitario descrito anteriormente y pueden estar contenidos en el agente inductor de inmunidad de la presente invención o se pueden preparar como una composición separada que debe administrarse a un paciente en combinación con el agente inductor de inmunidad de la presente invención.

55

60

Poniendo en contacto el polipéptido descrito anteriormente con células presentadoras de antígeno *in vitro*, las células presentadoras de antígeno se pueden hacer para presentar el polipéptido. Es decir, los polipéptidos (a) a (c) descritos anteriormente se pueden utilizar como agentes para el tratamiento de las células presentadoras de antígeno. Entre los ejemplos de las células presentadoras de antígeno que se pueden usar preferentemente se

65

incluyen células dendríticas y células B que tienen moléculas del MHC de clase I. Se han identificado varias moléculas del MHC de clase I y son bien conocidas. Las moléculas del MHC en seres humanos se denominan HLA. Entre los ejemplos de moléculas de HLA de clase I se incluyen HLA-A, HLA-B y HLA-C, más específicamente HLA-A1, HLA-A0201, HLA-A0204, HLA-A0205, HLA-A0206, HLA-A0207, HLA-A11, HLA-A24, HLA-A31, HLA-A6801, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B2705, HLA-B37, HLA-Cw0401 y HLA-Cw0602.

Las células dendríticas o células B que tienen moléculas de MHC de clase I pueden prepararse a partir de la sangre periférica mediante un método bien conocido. Por ejemplo, las células dendríticas específicas de tumor se pueden inducir mediante la inducción de células dendríticas de la médula ósea, sangre del cordón umbilical o de sangre periférica del paciente usando factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-3 (o IL-4), y, después, la adición de un péptido relacionado con tumor al sistema de cultivo.

Mediante la administración de una cantidad eficaz de dichas células dendríticas se puede inducir una respuesta deseada para el tratamiento de un cáncer. Como células, se pueden usar médula ósea o sangre del cordón umbilical donados por un individuo sano, o de médula ósea, sangre periférica o similar del paciente. Cuando se utilizan células autólogas del paciente, se puede conseguir una seguridad elevada y se espera evitar los efectos secundarios graves. La sangre periférica o la médula ósea puede ser cualquiera de una muestra reciente, una muestra almacenada en frío y una muestra crioconservada. En cuanto a la sangre periférica, la sangre entera puede cultivarse o los componentes leucocitarios solos se pueden separar y cultivar, y esto último es más eficiente y, por lo tanto, preferente. Además, entre los componentes leucocitarios se pueden separar las células mononucleares. En los casos en que las células proceden de la médula ósea o de sangre de cordón umbilical, las células enteras que constituyen la médula ósea pueden cultivarse, o las células mononucleares pueden separarse y cultivarse. La sangre periférica, los componentes leucocitarios de la misma y las células de la médula ósea contienen células mononucleares, células madre hematopoyéticas y células dendríticas inmaduras, a partir de las que se originan las células dendríticas, y también las células positivas para CD4 y similares. El método de producción de la citocina no está restringido y se puede usar una citocina de origen natural o recombinante o similar siempre que se hayan confirmado su seguridad y la actividad fisiológica. Preferentemente, se usa una preparación con calidad garantizada para uso médico en la cantidad mínima necesaria. La concentración de la citocina o citocinas que se va a añadir no está restringida, siempre que se induzcan las células dendríticas a la concentración y, por lo general, la concentración total de la citocina o citocinas es, preferentemente, de aproximadamente 10 a 1000 ng/ml, más preferentemente de aproximadamente de 20 a 500 ng/ml. El cultivo puede llevarse a cabo utilizando un medio bien conocido por lo general usado para el cultivo de leucocitos. La temperatura de cultivo no está restringida siempre que la proliferación de los leucocitos sea posible a la temperatura, y una temperatura de aproximadamente 37 °C, que es la temperatura del cuerpo humano, es la más preferente. El medio ambiente atmosférico durante el cultivo no está restringido, siempre que la proliferación de los leucocitos sea posible en el medio ambiente, y el cultivo se lleva a cabo, preferentemente, en un flujo de 5 % de CO<sub>2</sub>. El periodo de cultivo no está restringido, siempre que se induzca induce un número necesario de las células, y, por lo general, desde 3 días hasta 2 semanas. En cuanto a los aparatos utilizados para la separación y cultivo de las células, se pueden usar aparatos apropiados, preferentemente aquellos cuya seguridad en la aplicación a usos médicos se ha confirmado y cuyas operaciones son estables y simples. En particular, entre los ejemplos del aparato de cultivo de células se incluyen no solo vasos generales, tales como placas Petri, matraces y frascos, sino también vasos de tipo capa, vasos de múltiples etapas, frascos de cultivo rotatorios, frascos de agitación, vasos de cultivo de de tipo bolsa y columnas de fibra hueca.

El método *per se* que se utilizará para poner el polipéptido descrito anteriormente en contacto con la células presentadoras de antígeno *in vitro* pueden ser bien conocido en la técnica. Por ejemplo, las células presentadoras de antígeno pueden cultivarse en un medio de cultivo que contiene el polipéptido descrito anteriormente. La concentración del péptido en el medio no está restringida y, por lo general, de aproximadamente 1 a 100 µg/ml, preferentemente de aproximadamente 5 a 20 µg/ml. La densidad celular durante el cultivo no está restringida y por lo general es de aproximadamente 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> células/ml, preferentemente de aproximadamente 5×10<sup>4</sup> a 5×10<sup>6</sup> células/ml. El cultivo se lleva a cabo, preferentemente, de acuerdo con un método convencional a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. La longitud máxima del péptido que se puede presentar en la superficie de las células presentadoras de antígeno normalmente es de aproximadamente 30 restos de aminoácidos. Por lo tanto, en los casos en que las células presentadoras de antígeno se ponen en contacto con el polipéptido *in vitro*, el polipéptido se puede preparar de tal manera que su longitud no es más de aproximadamente 30 restos de aminoácidos, aunque la longitud no está restringida.

Mediante el cultivo de las células presentadoras de antígeno en la coexistencia del polipéptido descrito anteriormente, el polipéptido se incorpora en las moléculas de MHC de las células presentadoras de antígeno y se presenta en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, utilizando el polipéptido descrito anteriormente, se pueden prepararlas células presentadoras de antígeno aisladas que contienen el complejo entre el polipéptido y la molécula de MHC. Tales células presentadoras de antígeno pueden presentar el polipéptido contra los linfocitos T *in vivo* o *in vitro*, para inducir y permitir la proliferación de los linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido.

Al poner las células presentadoras de antígenos preparadas de este modo que tienen el complejo entre el polipéptido descrito anteriormente y la molécula de MHC con linfocitos T *in vitro*, se puede inducir y permitir la

proliferación de los linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido. Esto puede llevarse a cabo mediante el cocultivo de las células presentadoras de antígenos descritas anteriormente y los linfocitos T en un medio líquido. Por ejemplo, las células presentadoras de antígeno pueden suspenderse en un medio líquido e introducirse en un recipiente tal como un pocillo de una microplaca, seguido de la adición de los linfocitos T al pocillo y, después, la  
 5 realización del cultivo. La proporción de mezcla de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T en el cocultivo no está restringida y, por lo general, es de aproximadamente 1:1 a 1:100, preferentemente de aproximadamente 1:5 a 1:20 en términos del número de células. La densidad de las células presentadoras de antígeno para su suspensión en el medio líquido no está restringida y normalmente es de aproximadamente 100 a 10.000.000 células/ml, de forma preferente de aproximadamente 10.000 a 1.000.000 células/ml. El cocultivo se lleva  
 10 a cabo, preferentemente, mediante un método convencional a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. El periodo de cultivo no está restringido y, por lo general, es 2 días a 3 semanas, preferentemente de aproximadamente 4 días a 2 semanas. El cocultivo se lleva a cabo, preferentemente, en presencia de una o más interleucinas tales como IL-2, IL-6, IL-7 y/o IL-12. En tales casos, la concentración de IL-2 o IL-7 es habitualmente de aproximadamente 5 a 20 U/ml, la concentración de IL-6 es normalmente de aproximadamente 500 a 2000 U/ml, y la concentración de IL-12 es normalmente de aproximadamente 5 a 20 ng/ml, pero las concentraciones de las interleucinas no están restringidas a las mismas. El cocultivo anterior puede repetirse de una a varias veces con adición de las células presentadoras de antígeno frescas. Por ejemplo, la operación de descartar el sobrenadante de cultivo después del cocultivo y añadir una suspensión recién obtenida de células presentadoras de antígeno para llevar a cabo aún más el cocultivo se puede repetir de una a varias veces. Las condiciones para cada cocultivo pueden ser las mismas que las  
 20 descritas anteriormente.

Mediante el cocultivo anteriormente descrito, se induce y permite la proliferación de los linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido. Por lo tanto, utilizando el polipéptido descrito anteriormente, se pueden preparar linfocitos T aislados que se unen selectivamente al complejo entre el polipéptido y la molécula de MHC.  
 25

Como se describe en los ejemplos a continuación, el gen de SCD1 se expresa específicamente en las células de cáncer de mama, cáncer de los tejidos mamarios, células de tumores cerebrales, tejidos tumorales de cerebro, células de cáncer de colon, tejidos de cáncer de colon, tejidos de adenocarcinoma perianal, células de adenocarcinoma perianal, tejidos de mastocitoma, células de mastocitoma, células de neuroblastoma, células de cáncer renal, tejidos de cáncer renal, células de cáncer de hígado, tejidos de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, tejidos de cáncer de pulmón, células de cáncer de próstata, tejidos de cáncer de próstata y células de leucemia. Por lo tanto, se piensa que, en estas especies de cáncer, existe una cantidad significativamente mayor de SCD1 que en las células normales. Cuando los linfocitos T citotóxicos preparados de este modo se administran a un cuerpo vivo, tal que una parte del polipéptido de SCD1 presente en las células cancerosas es presentado por las moléculas de MHC en la superficie de las células cancerosas, los linfocitos T citotóxicos pueden dañar las células cancerosas mediante el polipéptido presentado como marcador. Dado que las células presentadoras de antígeno que presentan una parte del polipéptido de SCD1 descrito anteriormente pueden inducir y permitir la proliferación de los linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido también in vivo, se puede dañar a las células cancerosas mediante la administración de las células presentadoras de antígeno a un cuerpo vivo. Esto es, los linfocitos T citotóxicos y las células presentadoras de antígenos preparadas utilizando el polipéptido también son eficaces como agentes terapéuticos y/o profilácticos para el cáncer, de forma similar al agente inductor de inmunidad de la presente invención.  
 30  
 35  
 40

En los casos en los que se administran las células presentadoras de antígeno aisladas descritas anteriormente o los linfocitos T aislados a un cuerpo vivo, estos se preparan, preferentemente, mediante el tratamiento de células presentadoras de antígeno o linfocitos T obtenidos del paciente que se va a tratar, utilizando el polipéptido (a), (b) o (c) como se ha descrito anteriormente con el fin de evitar la respuesta inmunitaria en el cuerpo vivo que ataca a estas células como cuerpos extraños.  
 45

El agente terapéutico y/o profiláctico para el cáncer que comprende como ingrediente eficaz las células presentadoras de antígeno o linfocitos T se administra, preferentemente, a través de una vía de administración parenteral, por ejemplo, mediante administración intravenosa o intraarterial. La dosis se selecciona apropiadamente dependiendo de los síntomas, el propósito de la administración y similares, y generalmente es de 1 célula a 10.000.000.000.000 células, preferentemente células de 1.000.000 a 1.000.000.000 células, cuya dosis se administra preferentemente de una vez cada varios días a una vez cada varios meses. La formulación puede ser, por ejemplo, las células suspendidas en solución salina fisiológica tamponada y de la formulación puede usarse en combinación con otro otra preparación(es)/anticancerígena y/o citocina (s). Además, también se pueden añadir uno o más aditivos bien conocidos en el campo de la formulación de productos farmacéuticos.  
 50  
 55

También mediante la expresión de un polinucleótido que codifica cualquiera de los polipéptidos (a) a (c) en el cuerpo del animal sujeto, se puede inducir la producción de anticuerpos y los linfocitos T citotóxicos en el cuerpo vivo, y se puede obtener un efecto comparable al obtenido en el caso de la administración del polipéptido. Es decir, el agente inductor de inmunidad de la presente invención puede ser una que comprende como ingrediente eficaz un vector recombinante que tiene un polinucleótido que codifica cualquiera de los polinucleótidos (a) a (c), en el que el vector recombinante es capaz de expresar el polipéptido en un cuerpo vivo. Dicho vector recombinante capaz de expresar un polipéptido antigénico como se muestra en los Ejemplos mencionados más adelante se denomina también  
 60  
 65

vacuna génica.

5 El vector utilizado para la producción de la vacuna del gen no está restringido, siempre que sea un vector capaz de expresar el polipéptido en una célula del animal sujeto (preferentemente en una célula de mamífero), y puede ser o bien un vector plasmídico o un vector viral, y se puede usar cualquier vector conocido en el campo de las vacunas de genes. El polinucleótido tal como ADN o ARN que codifica el polipéptido descrito anteriormente se puede preparar fácilmente como se mencionó anteriormente mediante un método convencional. La incorporación del polinucleótido en el vector puede llevarse a cabo utilizando un método bien conocido para los expertos en la técnica.

10 La vía de administración de la vacuna genética es, preferentemente, una ruta parenteral tal como administración intramuscular, subcutánea, intravenosa o administración intraarterial. La dosis puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del tipo de antígeno y similares, y es habitualmente de aproximadamente 0,1 µg a 100 mg, preferentemente de aproximadamente 1 µg a 10 mg en términos del peso de la vacuna génica por kg de peso corporal.

15 Entre los ejemplos del método que usan un vector de virus se incluyen aquellos en los que un polinucleótido que codifica el polipéptido descrito anteriormente se incorpora en un virus de ARN o virus de ADN, tal como un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus herpes, virus vacunal, virus de la viruela, poliovirus o virus Sindbis, y, después, se infecta a un sujeto con el virus resultante. Entre estos métodos, los que utilizan un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus vacunal o similar son especialmente preferentes.

20 Entre los ejemplos de otros métodos se incluyen un método en el que un plásmido de expresión se administra directamente por vía intramuscular (método de vacuna de ADN), y el método de liposomas, método de lipofectina, método de microinyección, método de fosfato de calcio y método de electroporación. El método de la vacuna de ADN y el método de liposomas son especialmente preferentes.

30 Los métodos para hacer que el gen que codifica el polipéptido descrito anteriormente utilizados en la presente invención actúe realmente como producto farmacéutico incluyen métodos in vivo en los que el gen se introduce directamente en el cuerpo, y métodos *ex vivo* en los que un cierto tipo de células se recogen del animal sujeto y el gen se introduce después las células *ex vivo*, seguido de la devolución de las células al cuerpo (Nikkei Science, 1994, abril, pág. 20-45; The Pharmaceutical Monthly, 1994, Vol. 36, No. 1, pág. 23-48; Experimental Medicine, Edición extra, 1994, Vol.12, n.º 15; y las referencias citadas en estas literaturas, y similares. Son preferentes los métodos in vivo.

35 En los casos en que el gen se administra por un método in vivo, el gen puede administrarse a través de una vía de administración apropiada dependiendo de la enfermedad a tratar, los síntomas y similares. El gen se puede administrar, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular. En los casos en que el gen se administra por un método in vivo, el gen puede formularse en una preparación tal como una solución, y en general, se formula en una solución de inyección o similar que contiene el ADN que codifica el péptido anteriormente descrito de la presente invención como ingrediente eficaz. Un vehículo de uso habitual también se puede añadir a la misma según se requiera. En los casos de un liposoma de liposomas de membrana de fusión (liposoma de virus Sendai (HVJ) o similares) que contiene el ADN, el liposoma se puede formular en una preparación de liposomas tal como una suspensión, la preparación congelada o la preparación congelada concentrada de forma centrífuga.

45 En la presente invención, "la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1" incluye no solo la secuencia de bases real de la SEQ ID NO: 1, sino también la secuencia complementaria de la misma. Por lo tanto, "el polinucleótido que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1" incluye el polinucleótido monocatenario que tiene la secuencia de bases real de la SEQ ID NO: 1, el polinucleótido monocatenario que tiene la secuencia de bases complementaria a la misma, y el polinucleótido bicatenario compuesto por estos polinucleótidos monocatenarios. Cuando se prepara un polinucleótido que codifica el polipéptido usado en la presente invención, una cualquiera de estas secuencias de bases se selecciona apropiadamente, y los expertos en la técnica pueden llevar a cabo la selección fácilmente.

### Ejemplos

55 La presente invención se describirá a continuación con más detalle mediante los ejemplos.

#### Ejemplo 1: Obtención de una nueva proteína antigénica del cáncer mediante el método SEREX

##### (1) Preparación de biblioteca de ADNc

60 El ARN total se extrajo del tejido testicular de un perro mediante el método de ácido-guanidinio-fenolcloroformo y el ARN poli (A) se purificó usando el kit de purificación de ARNm Oligotex-dT3 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) de acuerdo con los protocolos incluidos en el kit.

65 La biblioteca de fagos de ADNc se sintetizó utilizando el ARNm obtenido (5 µg). Para la preparación de una biblioteca de fagos de ADNc se usaron el kit de síntesis de ADNc, kit de síntesis ZAP-cDNA y el kit ZAP-cDNA

GigapackIII Gold Cloning Kit (fabricado de STRATAGENE) de acuerdo con los protocolos incluidos en los kits. El tamaño de la biblioteca de fagos de ADNc preparada era  $1 \times 10^6$  ufp/ml.

(2) Detección selectiva de la biblioteca de ADNc con suero

5 La detección selectiva inmunológica se llevó a cabo utilizando la biblioteca de fagos de ADNc preparada de este modo. En concreto, las células huésped *E. coli* (XL1–Blue MRF<sup>+</sup>) se infectaron con la biblioteca de modo que 2.340 clones aparecieron en una placa de agarosa NZY con un tamaño de 90 mm diam.  $\times$  15 mm, y se cultivaron a 42 °C durante de 3 a 4 horas para permitir que los fagos formaran placas. La placa se cubrió con la membrana de nitrocelulosa (Hybond C Extra: fabricada por GE Healthcare Bio-Science) impregnada con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) a 37 °C durante 4 horas para inducir y expresar proteínas y las proteínas se transfirieron a la membrana. Posteriormente, la membrana se recuperó y se sumergió en TBS (Tris-HCl 1 mM, NaCl 15 mM, pH 7,5) suplementado con 0,5 % de leche desgrasada seca. A continuación, la membrana se agitó a 4 °C durante la noche para suprimir las reacciones no específicas. Después, se dejó que este filtro reaccionara con suero de paciente canino diluido 500 veces a temperatura ambiente durante de 2 a 3 horas.

20 Como suero del paciente canino descrito anteriormente se utilizó el suero recogido de un paciente canino con un tumor perianal. El suero se almacenó a -80 °C y se trató previamente inmediatamente antes de usar. El método de pretratamiento de suero fue el siguiente. Es decir, el huésped *E. coli* (XL1–Blue MRF<sup>+</sup>) se infectó con el fago  $\lambda$  ZAP Express que no tiene ningún gen extraño insertado y, después, se cultivó en medio de placa NZY a 37 °C durante la noche. Posteriormente, a la placa se añadió tampón NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M (pH 8,3) suplementado con NaCl 0,5,5M y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 15 horas, seguido de la recuperación del sobrenadante como un extracto de *E. coli*/fago. A continuación, el extracto de *E. coli*/fago recogido se pasó a través de una columna de NHS (fabricada por GE Healthcare Bio-Science) para inmovilizar las proteínas derivadas de *E. coli*/fago sobre la misma. El suero del paciente canino se pasó a su través y se hizo reaccionar con esta columna de proteína inmovilizada para eliminar los anticuerpos que se adsorben en *E. coli* y/o el fago. La fracción de suero que se pasó a través de la columna se diluyó 500 veces con TBS suplementado con leche desgrasada seca al 0,5 %, y el diluyente resultante se utilizó como material para la inmunoselección.

30 La membrana sobre la cual se transfirió dicho suero tratado y la proteína de fusión descrita anteriormente se transfirió y se lavó 4 veces con TBS-T (0,05 % de Tween 20/TBS), y se hizo reaccionar con IgG de cabra anti-perro (conjugado de IgG-h de cabra anti-perro +I HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) diluido 5.000 veces con TBS suplementado con 0,5 % de leche desgrasada seca como anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de detección mediante reacción de coloración enzimática usando una solución de reacción NBT/BCIP (fabricada por Roche). Las colonias en las posiciones correspondientes a los sitios positivos a la reacción de coloración se recuperaron de la placa con agarosa NZY que tiene un tamaño de 90 mm de diámetro.  $\times$  15 mm y se disolvieron en 500  $\mu$ l de tampón SM (NaCl 100 mM, MgClSO<sub>4</sub> 10 mM, Tris–HCl 50 mM, 0,01 % de gelatina; pH 7,5). La detección selectiva se repitió como la segunda y tercera detección selectiva de la misma manera que se ha descrito anteriormente hasta que se obtuvo una sola colonia positiva a la reacción de coloración. El aislamiento del único clon positivo se logró después de la detección selectiva de 9110 clones de fagos reactivos con IgG en el suero.

(3) Búsqueda de homología de secuencia del gen del antígeno aislado

45 Con el fin de someter el único clon positivo aislado mediante el método descrito anteriormente a análisis de la secuencia de bases se llevó a cabo una operación de conversión del vector de fagos en un vector plasmídico. Más específicamente, 200  $\mu$ l de una solución preparada de tal forma que *E. coli* huésped (XL1–Blue MRF<sup>+</sup>) estaba contenida a una absorbancia de DO<sub>600</sub> de 1,0 se mezcló con 100  $\mu$ l de la solución de fago purificado y también 1  $\mu$ l del fago colaborador ExAssist (fabricado por STRATAGENE), y después se dejó que la reacción progresara a 37 °C durante 15 minutos. A esto le siguió la adición de 3 ml de medio LB a la mezcla de reacción, y el cultivo se realizó con la mezcla resultante a 37 °C durante 2,5 a 3 horas. El cultivo resultante se incubó inmediatamente en un baño de agua a 70 °C durante 20 minutos. Después, el cultivo se centrifugó a 4 °C a 1.000  $\times$  g durante 15 minutos, y el sobrenadante se recuperó como una solución de fagemido. Posteriormente, 200  $\mu$ l de una solución preparada de tal manera que el huésped fagemido *E. coli* (SOLR) estaba contenido a una absorbancia DO<sub>600</sub> de 1,0 se mezcló con 10  $\mu$ l de una solución de fago purificado, y la reacción se dejó proceder a 37 °C durante 15 minutos. A partir de entonces, 50  $\mu$ l de la mezcla de reacción se sembraron en placas con medio agar LB suplementado con ampicilina (concentración final: 50  $\mu$ g/ml), y el cultivo se llevó a cabo a 37 °C durante la noche. Se recuperó una sola colonia de la SOLR transformado y se cultivó en medio LB suplementado con ampicilina (concentración final: 50  $\mu$ g/ml) a 37 °C, seguido de purificación de ADN plásmido que tiene el inserto de interés usando el kit QIAGEN Plasmid Miniprep Kit (fabricado por Qiagen).

65 El plásmido purificado se sometió a análisis de la secuencia de longitud completa del inserto por el método de paseo con cebador utilizando el cebador T3 de la SEQ ID NO: 7 y el cebador T7 de la SEQ ID NO: 8. Mediante este análisis de secuencias, se obtuvo la secuencia del gen de la SEQ ID NO: 1. Usando la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de este gen, la búsqueda de homología frente a genes conocidos se llevó a cabo usando un programa de búsqueda de homología BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Como resultado, se reveló

que el gen obtenido es el gen de SCD1. La SCD1 humana, que es un factor homólogo humano de SCD1 de perro, tenía una identidad de secuencia del 89 % en términos de la secuencia de bases y del 90 % en términos de la secuencia de aminoácidos; la SCD1 de ratón, que es un factor homólogo de ratón, tenía una identidad de secuencia del 84 % en términos de la secuencia de bases y del 84 % en términos de la secuencia de aminoácidos. La secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de SCD1 humana se muestran en las SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente, y la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de SCD1 de ratón se muestran en las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

(4) Análisis de la expresión en diversos tejidos

La expresión de los genes obtenidos por el método anterior en tejidos normales de perro, humanos y de ratón y varias líneas celulares se investigó por el método de RT-PCR (transcripción inversa-PCR). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo como sigue: Es decir, de 50 a 100 mg de cada tejido o de  $5 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  cells células de cada línea celular, se extrajo el ARN total usando el reactivo TRIZOL (fabricado por Invitrogen) de acuerdo con el protocolo descrito en las instrucciones adjuntas. Mediante el uso de este ARN total, se sintetizó ADNc con el sistema de síntesis de primera hebra Superscript para RT-PCR (fabricado por Invitrogen) de acuerdo con el protocolo descrito en las instrucciones adjuntas. Como los ADNc de tejidos normales humanos (cerebro, hipocampo, testículo, colon y placenta), se usaron ADNc de Gene Pool (fabricado por Invitrogen), ADNc de QUICK-Clone (fabricado por CLONETECH) y la biblioteca de ADNc de Large-Insert (fabricada por CLONETECH). La reacción de PCR se realizó usando cebadores específicos para el gen obtenido (los cebadores de perros muestran en las SEQ ID NOs: 9 y 10, los cebadores humanos que se muestran en las SEQ ID NO: 11 y 12, y los cebadores de ratón mostrados en las SEQ ID NOs: 13 y 14) como se describe a continuación. Es decir, los reactivos y el tampón unido se mezclaron de tal manera que 0,25  $\mu$ l de la muestra preparada por la reacción de transcripción inversa, 2  $\mu$ M de cada uno de los cebadores anteriores, 0,2 mM de cada uno de los dNTP, y 0,65 U de polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) estaban contenidos en la mezcla resultante en un volumen final de 25  $\mu$ l y la reacción se llevó a cabo mediante 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto usando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Como control para la comparación, cebadores específicos para GAPDH (los cebadores de GAPDH de perros y de ser humano se muestran en las SEQ ID NOs: 15 y 16; y los cebadores de GAPDH de ratón se muestran en las SEQ ID NOs: 17 y 18) se usaron al mismo tiempo. Como resultado, como se muestra en la Figura 1, el gen de SCD1 de perro no se expresó en la mayoría de los tejidos de perro sano, mientras que el gen se expresa fuertemente en los tejidos tumorales de perro. También en términos de los genes de SCD1 de ratón humanos, la expresión no se observó en la mayoría de los tejidos humanos y de ratón normales, mientras que se detectó la expresión en la mayoría de las líneas celulares de cáncer (figuras 2 y 3), como en el caso del gen de SCD1 de perro.

(5) Análisis cuantitativo de la expresión en diversos tejidos

El gen obtenido por el método anterior se sometió a investigación de la expresión en tejidos normales humanos por el método de RT-PCR. (PCR con transcripción inversa). Como ADNc de tejidos normales y tejidos cancerosos humanos, se utilizó el Panel de exploración de cáncer de Tiempo Real en barridos de tejidos (fabricado por ORIGENE). La RT-PCR cuantitativa se realizó utilizando el ciclador térmico CFX96 Real Time System – C1000 Thermal Cycler, fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc. La reacción de PCR se llevó a cabo como sigue usando cebadores específicos para el gen obtenido (mostrados en las SEQ ID NO: 11 y 12). Es decir, 5  $\mu$ l de la muestra de ADNc, 2  $\mu$ M de cada uno de los cebadores y los reactivos y el tampón contenido en 2  $\times$  SYBR Premezcla Ex TaqII polimerasa (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) se mezclaron conjuntamente para preparar una mezcla en un volumen final de 20  $\mu$ l y la reacción se llevó a cabo mediante 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto. Como resultado, el nivel de expresión del gen de SCD1 en cada uno de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata y cáncer de pulmón no fue menos de 4 veces más alto que el nivel de expresión en su tejido normal correspondiente. Basándose en estos resultados, se puede esperar que no haya preocupación porque aparezcan efectos secundarios por los agentes antitumorales dirigidos a SCD1 en tejidos normales y que el beneficio del efecto farmacológico de los agentes exceda en gran medida el riesgo de sus efectos secundarios.

**Ejemplo 2:** Análisis de antigenicidad del cáncer de SCD1 in vivo

(1) Preparación del vector recombinante que expresa SCD1 *in vivo*

Basándose en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 5, se preparó un vector recombinante que expresa SCD1 *in vivo*. La PCR se preparó a partir de la línea celular de cáncer de ratón N2a (adquirida de la ATCC), que mostró la expresión en el ejemplo 1. Los reactivos y el tampón unido se mezclaron de tal manera que 1  $\mu$ l del ADNc, 0,4  $\mu$ M de cada uno de dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción *HindIII* y *XbaI* (que se muestran en las SEQ ID NO: 19 y 20), dNTP 0,2 mM y 1,25 U de polimerasa PrimeStar SA (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) estuvieran contenidos en la mezcla resultante en un volumen final de 50  $\mu$ l y la PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 4 minutos usando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Los dos tipos de cebadores descritos anteriormente fueron los de amplificación de la región que codifica la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. Después de la PCR, el

ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando 1 % de gel de agarosa, y un fragmento de DNA de aproximadamente 1000 pb se purificó utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por QIAGEN).

5 El fragmento de ADN purificado se ligó en el vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). *E. coli* se transformó con el producto de ligación resultante, y luego se recuperó el plásmido. La secuencia del fragmento génico amplificado se confirmó que era la misma que la secuencia de interés mediante secuenciación. El plásmido que tiene la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI*, y se purificó usando el kit QIAquick Gel Extraction, seguido de la inserción de la secuencia del gen de interés en un vector de expresión de mamífero pcDNA3.1 (fabricado por Invitrogen) que habían sido tratados con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI*. Uso de este vector permite la producción de la proteína de SCD1 en las células de mamífero.

15 A 100 µg del ARN plasmídico preparado de este modo se añadieron 50 µg de partículas de oro (fabricadas por Bio Rad), 100 µl de espermidina (fabricado por SIGMA) y 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 1 M (fabricado por SIGMA) y la mezcla resultante se agitó en vórtex, para después dejar la mezcla en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente (las partículas resultantes se denominan en lo sucesivo en el presente documento partículas de ADN-oro). Después, la mezcla se centrifugó a 3.000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante, seguido de lavado del precipitado 3 veces con etanol al 100 % (fabricado por WAKO). A las partículas de ADN-oro, se añadieron 6 ml de etanol al 100 % y la mezcla resultante se agitó suficientemente mediante vórtex, para después verter las partículas de ADN-oro en tubos Tefzel (fabricados por Bio Rad) y permitir que las partículas precipitaran en la superficie de la pared. El etanol se retiró mediante secado al aire de los tubos Tefzel, al que se unieron las partículas de ADN-oro y, después, el tubo se cortó en trozos con una longitud que sea adecuada para una pistola de genes.

(2) Efecto antitumoral de SCD1 mediante el método de vacuna de ADN

25 El tubo preparado anteriormente se fijó en una pistola de genes y la vacuna de ADN se administró por vía transdérmica mediante la aplicación de una presión de 400 psi usando gas helio puro, un total de 3 veces a intervalos de 7 días, a la cavidad abdominal de cada uno de 10 ratones A/J individuales (de 7 semanas de edad, machos, adquiridos en Japan SLC) y ratones Balb/c (de 7 semanas de edad, machos, adquiridos en Japan SLC) cuyo pelo se había afeitado (esto corresponde a la inoculación de 2 µg/individuo del ADN plasmídico).

30 A continuación, una línea celular de neuroblastoma de ratón N2a o una línea celular de cáncer de colon CT26 se trasplantaron a cada ratón en una cantidad de  $1 \times 10^6$  células para evaluar el efecto antitumoral (modelo profiláctico). Para cada modelo, el ADN plasmídico que no contiene ningún gen de SCD1 insertado se administró a 10 individuos de ratones para proporcionar un control.

35 El efecto antitumoral se evaluó basándose en el tamaño del tumor (eje mayor  $\times$  eje menor<sup>2/2</sup>) y la proporción de ratones vivos. Como resultado de este estudio, en el modelo profiláctico que utiliza la línea celular de neuroblastoma, el tamaño del tumor se convirtió en .2966 mm<sup>3</sup> y 7.59 mm<sup>3</sup> el día 43 en el grupo control y el grupo al que se administró el plásmido con SCD1, respectivamente. Por lo tanto, se observó una notable regresión del tumor en el grupo al que se administró el plásmido con SCD1. Además, como resultado de la observación de la supervivencia en el modelo profiláctico usando la línea celular de neuroblastoma, se encontró que todos los casos habían muerto el día 74 después de la administración en el grupo de control, mientras que el 60 % de los ratones sobrevivió en el grupo al que se administró el plásmido con SCD1. Estos resultados indican un efecto antitumoral significativo en el grupo al que se administró el plásmido con SCD1 en comparación con el grupo control. De un modo similar, en el modelo profiláctico usando la línea celular de cáncer de colon, el tamaño del tumor se convirtió en 2.518 mm<sup>3</sup> y 604 mm<sup>3</sup> el día 33 en el grupo control y en el grupo al que se administró el plásmido con SCD1, respectivamente. Por lo tanto, se observó una notable regresión del tumor en el grupo al que se administró el plásmido con SCD1. Además, como resultado de la observación de la supervivencia, se encontró que todos los casos habían muerto el día 54 después de la administración en el grupo control, mientras que el 50 % de los ratones sobrevivió en el grupo al que se administró el plásmido con SCD1. Estos resultados indican un efecto antitumoral significativo en el grupo al que se administró el plásmido con SCD1 en comparación con el grupo control.

**Ejemplo 3:** Preparación de proteína recombinante humana SCD1 y evaluación de su capacidad inductora de inmunidad

55 (1) Preparación de la proteína SCD1 humana recombinante

Basándose en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3, se preparó una proteína recombinante SCD1 humana. Los reactivos y el tampón unido se mezclaron de tal manera que 1 µl del ADNc preparado del ejemplo 1 cuya expresión se pudo confirmar para los ADNc de diversos tejidos y células mediante el método de RT-PCR, 0,4 µM de cada uno de dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* (que se muestran en las SEQ ID NO: 25 y 26), dNTP 0,2 mM y 1,25 U de polimerasa PrimeStar SA (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) estuvieran contenidos en la mezcla resultante en un volumen final de 50 µl y la PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 4 minutos, usando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Los dos tipos de cebadores descritos anteriormente fueron los de amplificación de la región que codifica la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Después de la PCR, el

ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando 1 % de gel de agarosa, y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1.000 pb utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por QIAGEN).

5 El fragmento de ADN purificado se ligó en el vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). *E. coli* se transformó con el producto de ligación resultante y, a continuación, se recuperó el plásmido. Se confirmó que la secuencia del fragmento génico amplificado era la misma que la secuencia de interés mediante secuenciación. El plásmido que tiene la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* y se purificó usando el kit QIAquick Gel Extraction, seguido de la inserción de la secuencia del gen de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET30a (fabricado por Novagen) que se había tratado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante fusionada a un marcador de His. *E. coli* para expresión, BL21 (DE3), se transformó con este plásmido, y se indujo la expresión con IPTG 1 mM, para permitir la expresión de la proteína de interés en *E. coli*.

15 (2) Purificación de la proteína SCD1 recombinante

La *E. coli* recombinante obtenida de este modo que expresa la SEQ ID NO: 4 se cultivó en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina/ml a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó aproximadamente 0,7, y después se añadió al cultivo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido en una concentración final de 1 mM, seguido del cultivo posterior de la *E. coli* recombinante a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos. El sedimento de las células bacterianas se suspendió en solución salina tamponada con fosfato y se sometió después a centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos, para lavar las células bacterianas.

25 Las células bacterianas se suspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y se sometieron a ultrasonidos en hielo. El líquido obtenido mediante los ultrasonidos de *E. coli* se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos, para obtener el sobrenadante como la fracción soluble y el precipitado como la fracción insoluble.

30 La fracción insoluble se suspendió en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y después se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 minutos. Esta operación se repitió dos veces para la eliminación de las proteasas.

35 El residuo se suspendió en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) suplementado con hidrocloreuro de guanidina 6 M y cloruro de sodio 0,15 M, y se dejó reposar a 4 °C durante 20 horas para desnaturalizar la proteína. A continuación, la suspensión se centrifugó a 6.000 rpm durante 30 minutos y la fracción soluble obtenida se colocó en una columna de quelato de níquel preparado mediante un método convencional (vehículo: Chelating Sepharose (marca comercial), Fast Flow (GE Health Care); volumen de la columna: 5 ml; tampón de equilibrio: tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) suplementado con hidrocloreuro de guanidina 6 M y cloruro de sodio 0,15 M), para después dejar el resultante en reposo a 4 °C durante la noche para permitir la adsorción del vehículo quelado con níquel. El portador de la columna se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante resultante. A continuación, el vehículo de la columna se suspendió en solución salina tamponada con fosfato y se volvió a cargar en la columna.

45 La fracción no adsorbida en la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón acetato 0,1 M (pH 4,0) suplementado con cloruro de sodio 0,5 M, e inmediatamente después, se llevó a cabo la elución con tampón acetato 0,1 M (pH 3,0) suplementado con cloruro de sodio 0,5 M, para obtener una fracción purificada, que se utilizó después como material para una prueba de administración. La presencia de la proteína de interés en cada fracción eluida se confirmó por tinción con Coomassie llevada a cabo de acuerdo con un método convencional.

50 El tampón de la preparación purificada obtenida por el método anterior se reemplazó con un tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM (pH 8,0)) y la muestra resultante se sometió a escisión del marcador His con el factor Xa de la proteasa y purificación de la proteína de interés, utilizando el kit de captura para escisión de Factor Xa (fabricado por Novagen), de acuerdo con el protocolo incluido en el kit. Posteriormente, el tampón de 12 ml de la preparación purificada obtenida por el método anterior se reemplazó por tampón fosfato fisiológico (fabricado por Nissui Pharmaceutical) usando ultrafiltración Nanosep 10K OMEGA (fabricado por PALL), y la muestra resultante se sometió a filtración aséptica a través de HT Tuffryn Acrodisc de 0,22 µm (fabricado por PALL) y se utilizó en el experimento.

55 (3) Inducción de linfocitos T citotóxicos positivos para CD8 reactivos con la proteína SCD1 recombinante humana

60 Se separó la sangre periférica de un individuo sano y la sangre periférica se colocó sobre medio de separación de linfocitos (OrganonpTeknika, Durham, NC), seguido de centrifugación del resultante a 1.500 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recuperó una fracción que contenía células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se lavó 3 (o más) veces en tampón fosfato frío para obtener PBMC. Las PBMC obtenidas se suspendieron en 20 ml de medio AIM-V (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EE.UU.) y se dejó que las células se adhirieran a un matraz de cultivo (Falcon) a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Se utilizaron las células no adherentes para la preparación de los linfocitos T y las células adherentes se utilizaron para la preparación de células dendríticas.

Por otro lado, las células adheridas se cultivaron en medio AIM-V en presencia de IL-4 (1000 U/ml) y GM-CSF (1000 U/ml). Se recogieron las células no adherentes obtenidas 6 días más tarde y se añadió la proteína de SCD1 humana recombinante a las células a una concentración de 10 µg/ml, seguido de cultivo de las células a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. A continuación, el medio se sustituyó por medio AIM-V suplementado con IL-4 (1000 U/ml), GM-CSF (1000 U/ml), IL-6 (1000 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA), IL-1β (10 ng/ml, Genzyme, Cambridge, MA), y TNF-α (10 ng/ml, Genzyme, Cambridge, MA) y el cultivo se llevó a cabo durante 2 días más para obtener una población de células no adherentes para su uso como células dendríticas.

Las células dendríticas preparadas se suspendieron en medio AIM-V a una densidad celular de 1 × 10<sup>6</sup> células/ml, y la proteína de SCD1 humana recombinante se añadió de nuevo a una concentración de 10 µg/ml. Usando una placa de 96 pocillos, las células se cultivaron a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. Después del cultivo, se llevó a cabo irradiación con rayos X (3000 rads) y las células se lavaron con medio AIM-V, seguido de suspensión en medio AIM-V suplementado con 10 % de suero AB humano (Nabi, Miami, FL), IL-6 (1000 U/ml) e IL-12 (10 ng/ml, Genzyme, Cambridge, MA). Las células se colocaron después en una placa de 24 pocillos en una cantidad de 1 × 10<sup>5</sup> células/pocillo. Además, se añadió a cada pocillo la población de linfocitos T preparada en cantidades de 1 × 10<sup>6</sup> células y se cultivaron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Cada sobrenadante del cultivo se descartó 7 días más tarde y las células dendríticas obtenidas de la misma manera que se ha descrito anteriormente mediante tratamiento con la proteína SCD1 humana y la posterior irradiación con rayos X se suspendieron en medio AIM-V suplementado con 10 % de suero AB humano (Nabi, Miami, FL), IL-7 (10 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA) e IL-2 (10 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA) (densidad celular: 1 × 10<sup>5</sup> células/ml). La suspensión resultante se añadió a la placa de 24 pocillos en una cantidad de 1 × 10<sup>5</sup> células/pocillo y las células se cultivaron adicionalmente. Después de repetir la misma operación de 4 a 6 veces a intervalos de 7 días, se recuperaron los linfocitos T estimulados y la inducción de linfocitos T positivos para CD8 se confirmó mediante citometría de flujo.

Como control negativo se usó una proteína que tiene una secuencia fuera del alcance de la presente invención (SEQ ID NO: 27).

Posteriormente, se estudió si los linfocitos T positivos para CD8 estimulados con el presente polipéptido pueden dañar a las células tumorales que expresan SCD1.

En un tubo de centrifuga de 50 ml se recogieron 10<sup>5</sup> células de una línea celular de glioma humana, U-87MG (adquirida en la ATCC), en la que se confirmó la expresión de SCD1, se recogieron y a las células se añadieron 100 µCi de cromo 51, seguido de incubación de la mezcla resultante a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con medio AIM-V suplementado con 10 % de suero AB humano y se colocaron en una placa de 96 pocillos de fondo en V en una cantidad de 10<sup>3</sup> células por pocillo. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 10<sup>5</sup>, 5×10<sup>4</sup>, 2,5×10<sup>4</sup> o 1,25×10<sup>4</sup> linfocitos T positivos para CD8, que se estimularon con la proteína de SCD1 humana recombinante y se suspendieron en medio AIM-V suplementado con 10 % de suero AB humano y el cultivo se realizó a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. A continuación, se midió la cantidad de cromo 51 liberado por las células tumorales dañadas en el sobrenadante del cultivo usando un contador gamma para calcular la actividad citotóxica de los linfocitos T positivos para CD8 estimulados con la proteína de SCD1 humana recombinante.

Como resultado, se encontró que los linfocitos T positivos para CD8 estimulados con la proteína de SCD1 humana recombinante tenían actividad citotóxica frente a U-87MG. Por otro lado, los linfocitos T positivos para CD8 inducidos utilizando la proteína de control negativo (SEQ ID NO: 27) no mostraron actividad citotóxica. Por lo tanto, se reveló que la proteína SCD1 humana recombinante utilizada en la presente invención tiene capacidad para inducir linfocitos T positivos para CD8 que pueden dañar a las células tumorales.

La actividad citotóxica significa la actividad citotóxica de los linfocitos T positivos para CD8 contra T98G determinada mediante: mezcla de 10<sup>5</sup> linfocitos T positivos para CD8 estimulados e inducidos como se ha descrito anteriormente, con 10<sup>3</sup> células de la línea celular de tumor cerebral maligno U-87MG en la que se incorporó cromo 51; cultivo de la mezcla resultante durante 4 horas; medición de la cantidad de cromo 51 liberado al medio después del cultivo; y, después, cálculo de acuerdo con la Ecuación 1.

Ecuación 1: Actividad citotóxica (%) = cantidad de cromo 51 liberado de U-87MG

después de la adición de linfocitos T CD8 + (cpm)/cantidad de cromo 51 liberado de

las células diana después de la adición de ácido clorhídrico 1 N (cpm) x 100

## Aplicabilidad industrial

La presente invención es útil para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, ya que la presente invención proporciona un agente inductor de inmunidad que contiene un polipéptido que ejerce actividad antitumoral contra diversos tipos de cáncer.

ES 2 589 706 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TORAY INDUSTRIES, INC.

<120> Agente inductor de inmunidad

5 <130> 12067

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.1

10 <210> 1  
<211> 5114

<212> ADN

15 <213> *Canis familiaris*

<220>

<221> CDS

<222> (164)..(1246)

20 <223>

<400> 1

```

ccgagccggc acgcgcgggc caggggaaggt tccgagagcg gcgccgcggg tcaccgcgca      60
gaagcgggct cggaaccga agtctactcc gcgggcgggc tgtcccggac tccgtgtgc      120
agtctcagcc gcgggaaggt gatccccgcc tcggagagcc cag atg ccg gcc cac      175
                                     Met Pro Ala His
                                     1
ttg ctg cag gag gag atc tct agc tcc tac aca acc acc acc acc atc      223
Leu Leu Gln Glu Glu Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr Thr Thr Thr Ile
5                               10                               15                               20
aca gcg cct ccc tcc agg atc ctg cag aat gga gga ggc aag ttg gag      271
Thr Ala Pro Pro Ser Arg Ile Leu Gln Asn Gly Gly Gly Lys Leu Glu
                               25                               30                               35
aag cct tcc cta tac ttg gaa gaa gac atc cgc cct gaa atc aaa gat      319
Lys Pro Ser Leu Tyr Leu Glu Glu Asp Ile Arg Pro Glu Ile Lys Asp
                               40                               45                               50
gac atc tac gac cca acc tac aag gat ccg gag ggc aga cca aag ccc      367
Asp Ile Tyr Asp Pro Thr Tyr Lys Asp Pro Glu Gly Arg Pro Lys Pro
                               55                               60                               65
aag gtt gag tat gtc tgg aga aac atc atc ctt atg tct ctg ctg cac      415
Lys Val Glu Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Met Ser Leu Leu His
70                               75                               80
gtg gga gcc ctg tat ggg atc aca ctg att ccc acc tgc aag acg tac      463
Val Gly Ala Leu Tyr Gly Ile Thr Leu Ile Pro Thr Cys Lys Thr Tyr
85                               90                               95                               100
acc tgg ctc tgg gtg ttc tcc tac tat ctg atc agc gct gtg ggc atc      511
Thr Trp Leu Trp Val Phe Ser Tyr Tyr Leu Ile Ser Ala Val Gly Ile
                               105                               110                               115
aca gca ggg gct cat cgg ctg tgg agt cac cgc acc tac aaa gct cgg      559
Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Thr Tyr Lys Ala Arg
                               120                               125                               130

```

ES 2 589 706 T3

ctg ccc ctg agg ctt ttc ctg atc att gcc aac acg atg gca ttc cag Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu Ile Ile Ala Asn Thr Met Ala Phe Gln 135 140 145	607
aat gac gtg tat gaa tgg gcc cga gat cac cgt gcc cac cac aag ttt Asn Asp Val Tyr Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Ala His His Lys Phe 150 155 160	655
tca gaa aca gat gct gat cct cac aat tcc cgg cgt ggc ttt ttc ttc Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ser Arg Arg Gly Phe Phe Phe 165 170 175 180	703
tct cac gtg ggt tgg ctg ctt gta cgc aaa cac cca gcc gtc aaa gag Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Ala Val Lys Glu 185 190 195	751
aag ggt ggt ttg cta gac ttg tct gac cta aaa gct gag aag ctg gtg Lys Gly Gly Leu Leu Asp Leu Ser Asp Leu Lys Ala Glu Lys Leu Val 200 205 210	799
atg ttc cag aga agg tac tac aaa cct ggc atc ctg ttg atg tgc ttc Met Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Ile Leu Leu Met Cys Phe 215 220 225	847
atc ctg ccc acc ttt gtg ccc tgg tat ttc tgg ggt gaa act ttt cta Ile Leu Pro Thr Phe Val Pro Trp Tyr Phe Trp Gly Glu Thr Phe Leu 230 235 240	895
cac agt gtg tgc gtt gct act ctc ctg cgt tac gcc att gtg ctc aat His Ser Val Cys Val Ala Thr Leu Leu Arg Tyr Ala Ile Val Leu Asn 245 250 255 260	943
gcc aca tgg ctg gtg aac agt gct gcc cac ctc tac gga tat cgc cct Ala Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Tyr Gly Tyr Arg Pro 265 270 275	991
tac gac aag aat att agc ccc cga gag aat atc ctg gtt tcc ctg gga Tyr Asp Lys Asn Ile Ser Pro Arg Glu Asn Ile Leu Val Ser Leu Gly 280 285 290	1039
gct gca ggg gag ggc ttc cac aac tac cac cac tcc ttt ccc tat gac Ala Ala Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Ser Phe Pro Tyr Asp 295 300 305	1087
tac tct gcc agt gag tac cgc tgg cac atc aac ttc acc acc ttc ttt Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Thr Thr Phe Phe 310 315 320	1135
atc gat tgc atg gct gcc ctc ggt ctg gct tac gac cgg aag aaa gta Ile Asp Cys Met Ala Ala Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Arg Lys Lys Val 325 330 335 340	1183
tcc aag gct gcc atc ttg gcc agg att aaa aga act gga gac gga agc Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Arg Ile Lys Arg Thr Gly Asp Gly Ser 345 350 355	1231
tac aag agt ggc tga gttttgggtc ctttgggttc cttttccaaa agccagccag Tyr Lys Ser Gly 360	1286
gcagaagttt aatgttctgt ttattaacta ctgaataatg ctaccaggat gctaaagatg	1346
atgatgtaa ccattccag tacagtattc ttttaaaatt gaaagccaac aattctgcct	1406

ES 2 589 706 T3

tcatgatgct aagctgatat tcttatttct tctcttatct tctctctctc ctagtccatt 1466  
 gtccttttct ttgctttggt cttatcacct tcctttctct cctcgctcat tgccctccag 1526  
 gcaaacagct ggtcattcag tggtaggtgt ccagcttcca aagcctagac aaccttttct 1586  
 ataatccaaa attaatgggc tttgtcccac ataactcttt ccttgagctg tcctgagctt 1646  
 tagggtgggt ggctcatgct agaggtatga taaaatcttc tgggaaggcc cctgttaatg 1706  
 atcttcaact caggcttttg tgagttggag tggaaaataa ctttatttgg cacaaagctt 1766  
 ctaaagcagc taaactgtca ggggagagag cgtgcatggt atgattgaga agtaaagatg 1826  
 gggtagatg ggaacaagg cagaagttca ggctgtgatt ggacacacag ttgggtgccta 1886  
 gtgaggacct caagcccat cagacagcat gcctcctttc tctcctgact ctgactaggg 1946  
 aatggccata gagcctggca atgctagatt acaaaagcaa atctcaatgt cccaatgtag 2006  
 tttaggttgg ggataaagaa gaagcattta gttttagtgc aaagtggctc ttgctgggga 2066  
 aggatttttt tttttttaa taacaggaag atttcttatt ccatattaca agaaatcttg 2126  
 aggttgggtg tttccagaat tggatgaatc agcagatcat ggaatcatca aaattctttc 2186  
 atctttctgc tctgccatct togggacatt ggtcagctcc atcatagtaa taactgtgct 2246  
 gaagcatttc cagacatcca aaaaaggaac atgtttgggg catagtgggt agcatggctg 2306  
 tcttccaaaa aaggaaggat ttaagaagt ggagttgggt ccgacataaa aataatatac 2366  
 attcactctg cttggaacat taaagtaatt cacttagggt atttccctct ggagaagagg 2426  
 agaaattagg tgggttctct actttcctct cactgctgga caggagatgg agagttcagg 2486  
 ggcaggtct gttggcaatt cctaagagaa aactttataa aagaagggtc ctgagaacac 2546  
 attgccagag gattcagagg gttactaaga aagtcaatgg gtgtcctgat ttggaagctg 2606  
 gttatacaag caagtaaagc tcagttcat tcattaattc catttctcct tgggatgagt 2666  
 aaaaactaga aggttctcc ccgagtgct gaaccatttc tccattctc tctctgctaa 2726  
 cttttcacct aaagtatagg actgcctggg gggggggcga ggtaggaatc taactactgt 2786  
 ggtttttgat tcctggctct acccttccg tccattttct cctaccggtt ctatctcctt 2846  
 cctccctgat gtgttcttct ctctctggac aggaagcctg ctttgtatgt attccgaggc 2906  
 agtgatgatt attgccacc gggcagctcc ctctcctgca gacagaatgc tcagggtcac 2966  
 tgaaccactg tttctcttta taaagttgag ttagctgcca ctttcaactg gcctccagag 3026  
 tctctccacc tacaccctg tggccctg ccacactgat gactcaagat gaggtggca 3086  
 aacgttacta gaaacatccc tggctcaggc actctctctc tcaggaggca cagccaggcc 3146  
 acatgctcgt gttgtgccag tgagccagcc acggagcaa aaacggtttg tttttaacct 3206  
 cctctgtctg gatcacaaca tgagagtatg ctgatgccc cctgcttctc cagtaagcct 3266

ES 2 589 706 T3

gccagccct agtccgtgct cccagcggac agtgcaatgc ttgtagaagt aggagggagc 3326  
 ctagtcttca ctgggaagca caagaagcaa aggaaagtcc caaagtgcct catgcaaaaag 3386  
 gaggccctgt tccctggagc caggggtgat tacgaagccg agacttggga tctgagatgc 3446  
 catgaacttt gctgaacagc atctctgttt ggcaaaactaa ccagcattcc ccaccacca 3506  
 gcctagggca aatggtagtg tagaagaggt ctgaaaaaaa gcaccagtgt tttgagaacc 3566  
 ttggactact catgtccctg tacctcagtc atcaatgcaa aggcctggct ttactctatg 3626  
 aaagattgga aatctacaat accaaatgtc ctgtgcattg ttgaggaata gtggaaagaa 3686  
 agaagccctt tcttcctgta ttaattgaat agacagaggc tacaggggtt ccctggacta 3746  
 aaggcatoot tgtcttttga gctgttctc tcagtagaaa caaatotaat ggaagatcac 3806  
 ggcgtagtgt agatctgctg acttgtgtac ctatctcttg gagatccctg ttgggtagtt 3866  
 ttaattccac aggttagcag atgcctgctt tctaattttg gacccaaaac aagcttatct 3926  
 ttctattcta atcacgtccc agggatctga cccataccat gacccttcac aagactggac 3986  
 aaggccctca ggctgagggc tcctatgact atgacaatgt ggaggtggag ggggtgtctac 4046  
 tgagtaagga acacttattt caagattcta aagctgagtt caattgacac attaatgatc 4106  
 cagaaactca agtctgaatt tctaacagtc ctcaactcgt gggtagctg acaacttatt 4166  
 tgggtgcctt acatctgttc taatcagtgt tgtatatgag cctacttccg ctccctctc 4226  
 gctccccctg tggagttcct ttgcacctgc gaccctacag aagtggttgg tagaaaagg 4286  
 ggctggctg gagaattatc agtatagcta ttcacaagat ttccttctgg gcttttttt 4346  
 tagggctgtt tttcttaagt gccacattt gatggagggg ggaagtaatt tgaatgtatt 4406  
 tgatttataa ttctttttag gttaaaagat ggtgtagcat ttaaaatgga aactttctct 4466  
 ccttggtttg ctagtatcct gagtgtattc tctgtaagta tagctcaaat gggtcagtgt 4526  
 gaaagggtta caaaagcaag atgtcaatgt tacgtgggtg gttaaggcca gggcctcccc 4586  
 taccactgtg ccaactgact gctgtgtgac cctgggcaag tcacttaact ataatgtgcc 4646  
 tcagttttcc ttctgttaaa atgggataat aatactgacc tacctcaaag ggcagtttg 4706  
 aggcgtgact aatgcttttt ataaagcatt ttgggatcct tcagcagagg aattctttta 4766  
 agtcctgagt atttttatag tagcagtatc caccgtgaac ttatgtccac cgtaaaccac 4826  
 gtgtcctatc attaatcgat attctctctg agagattgga taaatccatt ggataagtgg 4886  
 tggataacta gccagacaaa atttgagaat gcataaactc attgccatgg aaacaataca 4946  
 caggatacct tttccttaat tgggtgggat tttttccctt ttatgtggga tagtagttat 5006  
 ttgtgaccta agaataattt tggaataatt tctattaata tcaactotga agcttagttg 5066  
 tactgatctg aaattgtggt tgttcataat aaaagtgaag tgaatctg 5114

<210> 2  
 <211> 360  
 <212> PRT

ES 2 589 706 T3

<213> *Canis familiaris*

<400> 2

Met Pro Ala His Leu Leu Gln Glu Glu Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser Arg Ile Leu Gln Asn Gly Gly  
 20 25 30

Gly Lys Leu Glu Lys Pro Ser Leu Tyr Leu Glu Glu Asp Ile Arg Pro  
 35 40 45

Glu Ile Lys Asp Asp Ile Tyr Asp Pro Thr Tyr Lys Asp Pro Glu Gly  
 50 55 60

Arg Pro Lys Pro Lys Val Glu Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Met  
 65 70 75 80

Ser Leu Leu His Val Gly Ala Leu Tyr Gly Ile Thr Leu Ile Pro Thr  
 85 90 95

Cys Lys Thr Tyr Thr Trp Leu Trp Val Phe Ser Tyr Tyr Leu Ile Ser  
 100 105 110

Ala Val Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Thr  
 115 120 125

Tyr Lys Ala Arg Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu Ile Ile Ala Asn Thr  
 130 135 140

Met Ala Phe Gln Asn Asp Val Tyr Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Ala  
 145 150 155 160

His His Lys Phe Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ser Arg Arg  
 165 170 175

Gly Phe Phe Phe Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro  
 180 185 190

Ala Val Lys Glu Lys Gly Gly Leu Leu Asp Leu Ser Asp Leu Lys Ala  
 195 200 205

Glu Lys Leu Val Met Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Ile Leu  
 210 215 220

ES 2 589 706 T3

Leu Met Cys Phe Ile Leu Pro Thr Phe Val Pro Trp Tyr Phe Trp Gly  
 225 230 235 240  
 Glu Thr Phe Leu His Ser Val Cys Val Ala Thr Leu Leu Arg Tyr Ala  
 245 250 255  
 Ile Val Leu Asn Ala Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Tyr  
 260 265 270  
 Gly Tyr Arg Pro Tyr Asp Lys Asn Ile Ser Pro Arg Glu Asn Ile Leu  
 275 280 285  
 Val Ser Leu Gly Ala Ala Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Ser  
 290 295 300  
 Phe Pro Tyr Asp Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe  
 305 310 315 320  
 Thr Thr Phe Phe Ile Asp Cys Met Ala Ala Leu Gly Leu Ala Tyr Asp  
 325 330 335  
 Arg Lys Lys Val Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Arg Ile Lys Arg Thr  
 340 345 350  
 Gly Asp Gly Ser Tyr Lys Ser Gly  
 355 360

- <210> 3
- <211> 5473
- 5 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (491)..(1570)
- <223>
- <400> 3

ES 2 589 706 T3

ggcaggacga ggtggcacca aattcccttc ggccaatgac gagccggagt ttacagaagc 60  
ctcattagca tttccccaga ggcaggggca ggggcagagg ccgggtggtg tgggtgctggt 120  
gtcggcagca tccccggcgc cctgctgcgg tcgccgcgag cctcggcctc tgtctcctcc 180  
ccctcccgcc cttacctca cgcgggaccg cccgcgccag tcaactcctc gcactttgcc 240  
cctgcttggc agcggataaa agggggctga ggaaataccg gacacggtca cccggtgcca 300  
gctctagcct ttaaattccc ggctcgggga cctccacgca ccgcggttag cgcgcacaac 360  
cagctagcgt gcaaggcgcc gcggctcagc gogtaccggc gggcttcgaa accgcagtcc 420  
tccggcgacc ccgaactccg ctcgggagcc tcagccccct ggaaagtgat cccggcatcc 480

ES 2 589 706 T3

gagagccaag atg ccg gcc cac ttg ctg cag gac gat atc tct agc tcc 529  
Met Pro Ala His Leu Leu Gln Asp Asp Ile Ser Ser Ser  
1 5 10

tat acc acc acc acc acc att aca gcg cct ccc tcc agg gtc ctg cag 577  
Tyr Thr Thr Thr Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser Arg Val Leu Gln  
15 20 25

aat gga gga gat aag ttg gag acg atg ccc ctc tac ttg gaa gac gac 625  
Asn Gly Gly Asp Lys Leu Glu Thr Met Pro Leu Tyr Leu Glu Asp Asp  
30 35 40 45

att cgc cct gat ata aaa gat gat ata tat gac ccc acc tac aag gat 673  
Ile Arg Pro Asp Ile Lys Asp Asp Ile Tyr Asp Pro Thr Tyr Lys Asp  
50 55 60

aag gaa ggc cca agc ccc aag gtt gaa tat gtc tgg aga aac atc atc 721  
Lys Glu Gly Pro Ser Pro Lys Val Glu Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile  
65 70 75

ctt atg tct ctg cta cac ttg gga gcc ctg tat ggg atc act ttg att 769  
Leu Met Ser Leu Leu His Leu Gly Ala Leu Tyr Gly Ile Thr Leu Ile  
80 85 90

cct acc tgc aag ttc tac acc tgg ctt tgg ggg gta ttc tac tat ttt 817  
Pro Thr Cys Lys Phe Tyr Thr Trp Leu Trp Gly Val Phe Tyr Tyr Phe  
95 100 105

gtc agt gcc ctg ggc ata aca gca gga gct cat cgt ctg tgg agc cac 865  
Val Ser Ala Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His  
110 115 120 125

cgc tct tac aaa gct cgg ctg ccc cta cgg ctc ttt ctg atc att gcc 913  
Arg Ser Tyr Lys Ala Arg Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu Ile Ile Ala  
130 135 140

aac aca atg gca ttc cag aat gat gtc tat gaa tgg gct cgt gac cac 961  
Asn Thr Met Ala Phe Gln Asn Asp Val Tyr Glu Trp Ala Arg Asp His  
145 150 155

cgt gcc cac cac aag ttt tca gaa aca cat gct gat cct cat aat tcc 1009  
Arg Ala His His Lys Phe Ser Glu Thr His Ala Asp Pro His Asn Ser  
160 165 170

cga cgt ggc ttt ttc ttc tct cac gtg ggt tgg ctg ctt gtg cgc aaa 1057  
Arg Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys  
175 180 185

cac cca gct gtc aaa gag aag ggg agt acg cta gac ttg tct gac cta 1105  
His Pro Ala Val Lys Glu Lys Gly Ser Thr Leu Asp Leu Ser Asp Leu  
190 195 200 205

gaa gct gag aaa ctg gtg atg ttc cag agg agg tac tac aaa cct ggc 1153  
Glu Ala Glu Lys Leu Val Met Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly  
210 215 220

ttg ctg atg atg tgc ttc atc ctg ccc acg ctt gtg ccc tgg tat ttc 1201  
Leu Leu Met Met Cys Phe Ile Leu Pro Thr Leu Val Pro Trp Tyr Phe  
225 230 235

tgg ggt gaa act ttt caa aac agt gtg ttc gtt gcc act ttc ttg cga 1249  
Trp Gly Glu Thr Phe Gln Asn Ser Val Phe Val Ala Thr Phe Leu Arg  
240 245 250

ES 2 589 706 T3

tat gct gtg gtg ctt aat gcc acc tgg ctg gtg aac agt gct gcc cac Tyr Ala Val Val Leu Asn Ala Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His 255 260 265	1297
ctc ttc gga tat cgt cct tat gac aag aac att agc ccc cgg gag aat Leu Phe Gly Tyr Arg Pro Tyr Asp Lys Asn Ile Ser Pro Arg Glu Asn 270 275 280 285	1345
atc ctg gtt tca ctt gga gct gtg ggt gag gcc ttc cac aac tac cac Ile Leu Val Ser Leu Gly Ala Val Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His 290 295 300	1393
cac tcc ttt ccc tat gac tac tct gcc agt gag tac cgc tgg cac atc His Ser Phe Pro Tyr Asp Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile 305 310 315	1441
aac ttc acc aca ttc ttc att gat tgc atg gcc gcc ctc ggt ctg gcc Asn Phe Thr Thr Phe Phe Ile Asp Cys Met Ala Ala Leu Gly Leu Ala 320 325 330	1489
tat gac cgg aag aaa gtc tcc aag gcc gcc atc ttg gcc agg att aaa Tyr Asp Arg Lys Lys Val Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Arg Ile Lys 335 340 345	1537
aga acc gga gat gga aac tac aag agt gcc tga gtttggggtc cctcaggttc Arg Thr Gly Asp Gly Asn Tyr Lys Ser Gly 350 355	1590
ctttttcaaa aaccagccag gcagaggttt taatgtctgt ttattaacta ctgaataatg	1650
ctaccaggat gctaaagatg atgatgttaa cccattccag tacagtattc ttttaaaatt	1710
caaaagtatt gaaagccaac aactctgcct ttatgatgct aagctgatat tatttcttct	1770
ottatocctc ctctottota ggocattgt cctccttttc actttattgc tatcgcctc	1830
ctttcoctta ttgcctcca ggcaagcagc tggctcagtct ttgctcagtg tccagcttcc	1890
aaagcctaga caacctttct gtagcctaaa acgaatggtc tttgctccag ataactctct	1950
ttccttgagc tgttgtgagc tttgaagtag gtggcttgag ctagagataa aacagaatct	2010
tctgggtagt cccctgttga ttatcttcag cccaggcttt tgctagatgg aatggaaaag	2070
caacttcatt tgacacaaag cttotaaagc aggtaaattg tcgggggaga gagttagcat	2130
gtatgaatgt aaggatgagg gaagcgaagc aagaggaacc tctcgccatg atcagacata	2190
cagctgccta octaatgagg acttcaagcc ccaccacata gcatgcttcc tttctctcct	2250
ggctcggggg aaaaagtggc tgoggtgttt ggcaatgcta attcaatgcc gcaacatata	2310
gttgaggccg aggataaaga aaagacattt taagtttgta gtaaaagtgg tctctgctgg	2370
ggaagggttt tcttttcttt ttttctttaa taacaaggag atttcttagt tcatatatca	2430
agaagtcttg aagttgggtg tttccagaat tggtaaaaac agcagctcat agaattttga	2490
gtattccatg agctgctcat tacagttctt tcctctttct gctctgccat cttcaggata	2550
ttggttcttc cctcatagt aataagatgg ctgtggcatt tccaaacatc caaaaaagg	2610

ES 2 589 706 T3

gaaggattta aggaggtgaa gtcgggtcaa aaataaaata tatatacata tatacattgc 2670  
 ttagaacgtt aaactattag agtatttccc ttccaaagag ggatgtttg aaaaaactct 2730  
 gaaggagagg aggaattagt tgggatgcca atttcctctc cactgctgga catgagatgg 2790  
 agaggctgag ggacaggatc tataggcagc ttctaagagc gaacttcaca taggaagggg 2850  
 tctgagaaca cgttgccagg ggcttgagaa ggttactgag tgagttattg ggagtcttaa 2910  
 taaaataaac tagatattag gtccattcat taattagttc cagtttctcc ttgaaatgag 2970  
 taaaaactag aaggcttctc tccacagtgt tgtgcccctt cactcatttt tttttgagga 3030  
 gaagggggtc tctgttaaca tctagcctaa agtatacaac tgcctggggg gcaggggttag 3090  
 gaatctcttc actaccctga ttcttgatc ctggetctac cctgtctgtc ccttttcttt 3150  
 gaccagatct ttctcttccc tgaacgtttt cttctttccc tggacaggca gcctcctttg 3210  
 tgtgtattca gaggcagtga tgacttgctg tccaggcagc tccctcctgc acacagaatg 3270  
 ctcaagggtca ctgaaccact gcttctcttt tgaagtaga gctagctgcc actttcacgt 3330  
 ggctcogca gtgtctccac ctacaccctt gtgtctccct gccacactga tggctcaaga 3390  
 caaggctggc aaaccctccc agaaacatct ctggcccaga aagcctctct ctccctccct 3450  
 ctctcatgag gcacagccaa gccaaagcgt catgttgagc cagtgggcca gccacagagc 3510  
 aaaagagggg ttatcttcag tcccctctct ctgggtcaga accagagggc atgctgaatg 3570  
 cccctgctt acttggtgag ggtgcccgc ctgagtcagt gctctcagct ggcagtgcaa 3630  
 tgctttaga agtaggagga aacagttctc actgggaaga agcaagggca agaacccaag 3690  
 tgctcacct cgaaaggagg cctgttccc tggagtcagg gtgaaactgca aagctttggc 3750  
 tgagacctgg gatttgagat accacaaaacc ctgctgaaca cagtgtctgt tcagcaaact 3810  
 aaccagcatt ccctacagcc tagggcagac aatagtatag aagtctggaa aaaaacaaaa 3870  
 acagaatttg agaaccttgg accactcctg tccctgtagc tcagtcatca aagcagaagt 3930  
 ctggctttgc tctattaaga ttggaaatgt aactaccaa aactcagtc cactgttgag 3990  
 cccagtgct ggaagggagg aaggcctttc ttctgtgta attgcgtaga ggctacaggg 4050  
 gttagcctgg actaaaggca tccttgtctt ttgagctatt cacctcagta gaaaaggatc 4110  
 taaggaaga tcaactgtag ttagttctgt tgacctgtgc acctaccct tggaaatgtc 4170  
 tgctggtatt tctaattcca caggtcatca gatgctgct tgataatata taaacaataa 4230  
 aaacaacttt cacttcttcc tattgtaatc gtgtgccatg gatctgatct gtacctgac 4290  
 cctacataag gctggatggc acctcaggct gagggcccca atgtatgtgt ggctgtgggt 4350  
 gtgggtggga gtgtgtctgc tgagtaagga acacgatttt caagattcta aagctcaatt 4410  
 caagtgacac attaatgata aactcagatc tgatcaagag tccggatttc taacagctct 4470  
 tgctttgggg ggtgtgctga caacttagct caggtgcctt acatcttttc taatcacagt 4530

ES 2 589 706 T3

gttgcatatg agcctgcocct cactcocctct gcagaatccc tttgcacotg agaccocctact 4590  
 gaagtggctg gtagaaaaag gggcctgagt ggaggattat cagtatcacg atttgcagga 4650  
 ttcccttctg ggcttcattc tggaaaacttt tgtaggggt gcttttctta agtgcccaca 4710  
 tttgatggag ggtggaaata atttgaatgt atttgattta taagtttttt tttttttttt 4770  
 gggttaaaag atggttgtag catttaaaat ggaaaatttt ctccttggtt tgctagtatc 4830  
 ttgggtgtat tctctgtaag tgtagctcaa ataggctcacc atgaaagggt aaaaaagcga 4890  
 ggtggccatg ttatgctggt ggttaaggcc agggcctctc caaccactgt gccactgact 4950  
 tgctgtgtga ccctgggcaa gtcacttaac tataagggtgc ctcagttttc cttctgttaa 5010  
 aatggggata ataatactga cctacotcaa agggcagttt tgaggcatga ctaatgcttt 5070  
 ttagaaagca ttttgggatc cttcagcaca ggaattctca agacctgagt attttttata 5130  
 ataggaatgt ccaccatgaa cttgatacgt ccgtgtgtcc cagatgctgt cattagtcta 5190  
 tatggttctc caagaaactg aatgaatcca ttggagaagc ggtggataac tagccagaca 5250  
 aaatttgaga atacataaac aacgcattgc cacggaaaca tacagaggat gcottttctg 5310  
 tgattgggtg ggattttttc cttttttatg tgggatatag tagttacttg tgacaagaat 5370  
 aattttggaa taatttctat taatatcaac tctgaagcta attgtactaa tctgagattg 5430  
 tgtttgttca taataaaagt gaagtgaatc tgattgcaaa aaa 5473

<210> 4  
 <211> 359  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 4

5

ES 2 589 706 T3

Met Pro Ala His Leu Leu Gln Asp Asp Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser Arg Val Leu Gln Asn Gly Gly  
 20 25 30

Asp Lys Leu Glu Thr Met Pro Leu Tyr Leu Glu Asp Asp Ile Arg Pro  
 35 40 45

Asp Ile Lys Asp Asp Ile Tyr Asp Pro Thr Tyr Lys Asp Lys Glu Gly  
 50 55 60

Pro Ser Pro Lys Val Glu Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Met Ser  
 65 70 75 80

Leu Leu His Leu Gly Ala Leu Tyr Gly Ile Thr Leu Ile Pro Thr Cys  
 85 90 95

ES 2 589 706 T3

Lys Phe Tyr Thr Trp Leu Trp Gly Val Phe Tyr Tyr Phe Val Ser Ala  
100 105 110

Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Ser Tyr  
115 120 125

Lys Ala Arg Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu Ile Ile Ala Asn Thr Met  
130 135 140

Ala Phe Gln Asn Asp Val Tyr Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Ala His  
145 150 155 160

His Lys Phe Ser Glu Thr His Ala Asp Pro His Asn Ser Arg Arg Gly  
165 170 175

Phe Phe Phe Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Ala  
180 185 190

Val Lys Glu Lys Gly Ser Thr Leu Asp Leu Ser Asp Leu Glu Ala Glu  
195 200 205

Lys Leu Val Met Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Leu Leu Met  
210 215 220

Met Cys Phe Ile Leu Pro Thr Leu Val Pro Trp Tyr Phe Trp Gly Glu  
225 230 235 240

Thr Phe Gln Asn Ser Val Phe Val Ala Thr Phe Leu Arg Tyr Ala Val  
245 250 255

Val Leu Asn Ala Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Phe Gly  
260 265 270

Tyr Arg Pro Tyr Asp Lys Asn Ile Ser Pro Arg Glu Asn Ile Leu Val  
275 280 285

Ser Leu Gly Ala Val Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Ser Phe  
290 295 300

Pro Tyr Asp Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Thr  
305 310 315 320

Thr Phe Phe Ile Asp Cys Met Ala Ala Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Arg  
325 330 335

Lys Lys Val Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Arg Ile Lys Arg Thr Gly

340

345

350

Asp Gly Asn Tyr Lys Ser Gly  
355

5 <210> 5  
<211> 4844  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*

10 <220>  
<221> CDS  
<222> (301)..(1368)  
<223>

<400> 5

```

cacctccacg cctggcttcc ttggetagct atctctgcmc tctttaccct ttgctggcag      60
ccgataaaag ggggctgagg aaatactgaa cacggctcgc ccatcgctg ctctaccctt      120
taaaatccca gccagggag atctgtgcac agccagaccg ggctgaacac ccatcccagag      180
agtcaggagg gcaggtttcc aagcgcagtt ccgccactcg cctacaccaa cgggctccgg      240
aaccgaagtc cacgctcgat ctcagcactg ggaaagtgag gcgagcaact gactatcgc      300
atg ccg gcc cac atg ctc caa gag atc tcc agt tct tac acg acc acc      348
Met Pro Ala His Met Leu Gln Glu Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr Thr
1          5          10          15
acc acc atc act gca cct ccc tcc gga aat gaa cga gag aag gtg aag      396
Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser Gly Asn Glu Arg Glu Lys Val Lys
          20          25          30
acg gtg ccc ctc cac ctg gaa gaa gac atc cgt cct gaa atg aaa gaa      444
Thr Val Pro Leu His Leu Glu Glu Asp Ile Arg Pro Glu Met Lys Glu
          35          40          45
gat att cac gac ccc acc tat cag gat gag gag gga ccc ccg ccc aag      492
Asp Ile His Asp Pro Thr Tyr Gln Asp Glu Glu Gly Pro Pro Pro Lys
          50          55          60
ctg gag tac gtc tgg agg aac atc att ctc atg gtc ctg ctg cac ttg      540
Leu Glu Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Met Val Leu Leu His Leu
          65          70          75
gga ggc ctg tac ggg atc ata ctg gtt ccc tcc tgc aag ctc tac acc      588
Gly Gly Leu Tyr Gly Ile Ile Leu Val Pro Ser Cys Lys Leu Tyr Thr
          85          90          95
tgc ctc ttc ggg att ttc tac tac atg acc agc gct ctg ggc atc aca      636
Cys Leu Phe Gly Ile Phe Tyr Tyr Met Thr Ser Ala Leu Gly Ile Thr
          100          105          110
gcc ggg gct cat cgc ctc tgg agc cac aga act tac aag gca cgg ctg      684
Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Thr Tyr Lys Ala Arg Leu
          115          120          125
ccc ctg cgg atc ttc ctt atc att gcc aac acc atg gcg ttc cag aat      732
Pro Leu Arg Ile Phe Leu Ile Ile Ala Asn Thr Met Ala Phe Gln Asn
          130          135          140

```

15

ES 2 589 706 T3

gac gtg tac gaa tgg gcc cga gat cac cgc gcc cac cac aag ttc tca	780
Asp Val Tyr Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Ala His His Lys Phe Ser	
145 150 155 160	
gaa aca cac gcc gac oct cac aat tcc cgc cgt ggc ttc ttc ttc tct	828
Glu Thr His Ala Asp Pro His Asn Ser Arg Arg Gly Phe Phe Phe Ser	
165 170 175	
cac gtg ggt tgg ctg ctt gtg cgc aaa cac ccg gct gtc aaa gag aag	876
His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Ala Val Lys Glu Lys	
180 185 190	
ggc gga aaa ctg gac atg tct gac ctg aaa gcc gag aag ctg gtg atg	924
Gly Gly Lys Leu Asp Met Ser Asp Leu Lys Ala Glu Lys Leu Val Met	
195 200 205	
ttc cag agg agg tac tac aag ccc gcc ctc ctg ctg atg tgc ttc atc	972
Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Leu Leu Leu Met Cys Phe Ile	
210 215 220	
ctg ccc acg ctg gtg ccc tgg tac tgc tgg gcc gag act ttt gta aac	1020
Leu Pro Thr Leu Val Pro Trp Tyr Cys Trp Gly Glu Thr Phe Val Asn	
225 230 235 240	
agc ctg ttc gtt agc acc ttc ttg cga tac act ctg gtg ctc aac gcc	1068
Ser Leu Phe Val Ser Thr Phe Leu Arg Tyr Thr Leu Val Leu Asn Ala	
245 250 255	
acc tgg ctg gtg aac agt gcc gcg cat ctc tat gga tat cgc ccc tac	1116
Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Tyr Gly Tyr Arg Pro Tyr	
260 265 270	
gac aag aac att caa tcc cgg gag aat atc ctg gtt tcc ctg ggt gcc	1164
Asp Lys Asn Ile Gln Ser Arg Glu Asn Ile Leu Val Ser Leu Gly Ala	
275 280 285	
gtg gcc gag gcc ttc cac aac tac cac cac acc ttc ccc ttc gac tac	1212
Val Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr Phe Pro Phe Asp Tyr	
290 295 300	
tct gcc agt gag tac cgc tgg cac atc aac ttc acc acg ttc ttc atc	1260
Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Thr Thr Phe Phe Ile	
305 310 315 320	
gac tgc atg gct gcc ctg gcc ctg gct tac gac cgg aag aaa gtt tct	1308
Asp Cys Met Ala Ala Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Arg Lys Lys Val Ser	
325 330 335	
aag gct act gtc tta gcc agg att aag aga act gga gac ggg agt cac	1356
Lys Ala Thr Val Leu Ala Arg Ile Lys Arg Thr Gly Asp Gly Ser His	
340 345 350	
aag agt agc tga gctttgggct tctgagttcc tgtttcaaac gttttctggc	1408
Lys Ser Ser	
355	
agagatttaa tattctggtg attaactaac aactggatat tgctatcggg gtgtaaatga	1468
tgcatттаac ctattcgggt acagtattct tataaaatga gaaagctttg atcacgtttt	1528
gaggaataaa atattttatt tagctaggat taaccatgcc acaagacatt atatatttct	1588

ES 2 589 706 T3

aagcacacat gataaatgca tatacaattt tgcacaacag ctttaaataa taacaataaa 1648  
tttgaacatt ctatacagag aggatcaaag ccaaggaaca tgctgttttg atgctagggt 1708  
gagcatggtg ctcagtcctt gtttgtttgc atggtgtcca gctttgtttc ttctctgtca 1768  
tcaccacott caggcaaata gttgaccaac cactggcctg tgtctgtcca cctccaag 1828  
cccaggccac ctttctgttt totgaaatac tgatccttcc tcctgaatac atcctcctt 1888  
gttcttagct tcaagactgc tgcctcaaac tagggataga gcaagtcccc gctgatgaag 1948  
ttcactgcag gttgtgctag atgggatgga gaaattatct tcatttgata cagagcaagt 2008  
agattgtctc gagagaaaag ttagcatgcy tggatgatt tgtaagtaaa gatggaagag 2068  
agagagagag agagagagag agagagagag agagaggtag ccatatctaa cagcctactt 2128  
accaaagacc ccaggcctct ctgcttggca tgcctccttt ctgtccatcc tctgaacccc 2188  
agagattagt gagatttgaa taattaaatc attttcagag tgaagggggt taatgcaggg 2248  
tctgtgctag gggagggttt tagcttttgg taactgaaga ttttttcatg gaaaaagtct 2308  
tcgtgttcaa tgtgcctaga actgataact aaacagctga catttgtcgg ggacagatat 2368  
ggtgtgaaac tatgaaaata taagcaaat cttcacttgg aacatgaaac tatttcactt 2428  
agaaaataat cgaaggacc cagggtgttgc ctgggttggc agtttctttc gtggctgggc 2488  
agaaactagt gaggttgagg ggcagtgtct gtaagtagct gctaagaggt gcatttccag 2548  
atgaagccct tggggaacat ctgccaggga tccgcatggt gttggctcca tccattgctt 2608  
tagtttctc cttggattgt gtagaaactt ggcttcccat ggttttgaac cttccatgcc 2668  
ttctttgctt tgtggccacc cagcctgcct agtgctgcct aggaagctct taccacctg 2728  
atctctctg acatttcttt ctttggcctt tttttctttc tcgggacatg cagctagttg 2788  
cctgagtgta tcaagagcac ccaggacttg ctgctgtcca ggctgttcc tccccagta 2848  
tccgtgggtg tggaagagct gtgtagcttc aggaagcaga gccaggtgcc acctttctgt 2908  
ggcttccaga tcctccctac ctccaactca tgtgcctctg tcacagtgat ttcaggaaag 2968  
cttgtagac cctctagcaa catctcggtt cagaaagtct ctctggtttg tgagttaaca 3028  
gctcagctaa gtgctgtttt gtctcagtga gttaaccact gaatgcgagg gttggttgtt 3088  
gatctgtctc ggtgtgtgtc ggagtagaca gcatatgcac ttctcctgt gcgctttgca 3148  
aggtaatgtg gctttggctg atccatgcag gcaggtagtg gtacagtgct gctgaaagga 3208  
agaagtccc cattttatct gttaaacac cagagacatg ggcaagtgct aatggacctc 3268  
acttcaggaa gaggtctgc ttctgaagc cagtgtgtga tgaaaagtga ctgagacctg 3328  
atatctaagg tgagacctga tacctaacac tctgtcacac agtccagggc caacagtgct 3388  
atagaaagt ctagaagaaa acatcacatc agtattttag aaccatcaac catctctgt 3448  
ccctatagcc caatccagag gcctggtttt tagaactggc tgtgtaaggt gccaaacact 3508

ES 2 589 706 T3

cagttcactt gtagaatcag agcctttttt cccccctatg ttaattgaac acggcctctg 3568  
 agctgttttg ttgaagtaga aaatctcata gaaaaatcac tgtagatcta ctgacctata 3628  
 gcctctgga aatgcotttg agatggtttt acttttctag gtcatagatg cctgatttat 3688  
 aagatgaaca ataaaatcag ctttctttct ttctctctctg atcttattcc ccagatctga 3748  
 ttcaggccat gttccaaagc aaggctacat tgaggtcctg gtgtctttaa gtaaaggaca 3808  
 tctttcagat cctctcaaag aaggatttat aacagtttcc agatgaatgt actaatagct 3868  
 ttgggtgect tatctcttct ctaatctgta gtgectgtga gctcagtctc actccttccc 3928  
 ttagcccgga gacccttag atcgagtggg aatagtcaag aggctggctg gagagtcac 3988  
 agtacattgg tttgcagaaa tcttttacag gctacatttt ggaatttttt tttttttagt 4048  
 aagtgatcaa atttgggtggg aagtaattcg agtgtattcg attgtattgt cgtcctcgtt 4108  
 atcattgtca aacatgttat agacggcagt tggcactggg gctgctaata tctgggtgta 4168  
 gtctctgaaa ctgtagctcc agtgaggtgg tgtgaaaggt tagcaaagcc accatctgct 4228  
 ggtggctcca gccaaagggtc ctcttagcca ctgaattgct atgttatcct ttctcttgta 4288  
 acaaaccac ccagagata aagcctttaa tcaaccaag aaactcctgg gctaagtatc 4348  
 tgacagtctc acatctcaac agtgtgaatt aagtgtccat agcatcagct caggaggaca 4408  
 ctctgggaga gtgctgacaa aaaagggtta ttaatactga cctactactt caagggcagt 4468  
 totgaggtga ttagagcttt ttttaaaaac caagtatttg gggatcctca gcagaggtat 4528  
 tcatacagac tcccaaagaa ctatatatgt tcctgagacc atcgtttagt ctacattgct 4588  
 ctteccagag actgacagat atgaccagtc aaagtgcaag actacctacc cactgccatg 4648  
 aaaaccattg caggaaacct ttccttccc tgaatgagat ttttttttct cctttttatg 4708  
 tggggtaatt atttgtgacc caagtgaat ttggatgatt tccattaata tcaactcttg 4768  
 aagcctactt gtactgattg agattgtatt tgttctaat aaaagtggat ctggttgtag 4828  
 tgtctgggaa aaaaaa 4844

<210> 6  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 6

Met Pro Ala His Met Leu Gln Glu Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser Gly Asn Glu Arg Glu Lys Val Lys  
 20 25 30

5

10

ES 2 589 706 T3

Thr Val Pro Leu His Leu Glu Glu Asp Ile Arg Pro Glu Met Lys Glu  
35 40 45

Asp Ile His Asp Pro Thr Tyr Gln Asp Glu Glu Gly Pro Pro Pro Lys  
50 55 60

Leu Glu Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Met Val Leu Leu His Leu  
65 70 75 80

Gly Gly Leu Tyr Gly Ile Ile Leu Val Pro Ser Cys Lys Leu Tyr Thr  
85 90 95

Cys Leu Phe Gly Ile Phe Tyr Tyr Met Thr Ser Ala Leu Gly Ile Thr  
100 105 110

Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Thr Tyr Lys Ala Arg Leu  
115 120 125

Pro Leu Arg Ile Phe Leu Ile Ile Ala Asn Thr Met Ala Phe Gln Asn  
130 135 140

Asp Val Tyr Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Ala His His Lys Phe Ser  
145 150 155 160

Glu Thr His Ala Asp Pro His Asn Ser Arg Arg Gly Phe Phe Phe Ser  
165 170 175

His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Ala Val Lys Glu Lys  
180 185 190

Gly Gly Lys Leu Asp Met Ser Asp Leu Lys Ala Glu Lys Leu Val Met  
195 200 205

Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Leu Leu Leu Met Cys Phe Ile  
210 215 220

Leu Pro Thr Leu Val Pro Trp Tyr Cys Trp Gly Glu Thr Phe Val Asn  
225 230 235 240

Ser Leu Phe Val Ser Thr Phe Leu Arg Tyr Thr Leu Val Leu Asn Ala  
245 250 255

Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Tyr Gly Tyr Arg Pro Tyr  
260 265 270

Asp Lys Asn Ile Gln Ser Arg Glu Asn Ile Leu Val Ser Leu Gly Ala  
275 280 285

ES 2 589 706 T3

Val Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr Phe Pro Phe Asp Tyr  
 290 295 300

Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Thr Thr Phe Phe Ile  
 305 310 315 320

Asp Cys Met Ala Ala Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Arg Lys Lys Val Ser  
 325 330 335

Lys Ala Thr Val Leu Ala Arg Ile Lys Arg Thr Gly Asp Gly Ser His  
 340 345 350

Lys Ser Ser  
 355

5 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador T3

<400> 7  
 aattaaccct cactaaaggg 20

15 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cebador T7

<400> 8  
 taatagcact cactatagg 19

25 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> cebador con sentido

<400> 9  
 gttgatgtgc ttcacctgc 20

35 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> cebador antisentido

45 <400> 10  
 aggtggtgaa gttgatgtgc 20

<210> 11

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador con sentido  
 <400> 11  
 gatgatgtgc ttcacctgc 20  
 10 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador antisentido  
 <400> 12  
 20 tgtggtgaag ttgatgtgcc 20  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador antisentido  
 30 <400> 13  
 tggctcttc ttctctcacg 20  
 <210> 14  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador antisentido  
 40 <400> 14  
 atatccatag agatgcgagg 20  
 <210> 15  
 <211> 18  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador de GAPDH  
 <400> 15  
 gggctgcttt taactctg 18  
 55 <210> 16  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador de GAPDH  
 <400> 16  
 ccaggaaatg agcttgac 18  
 65 <210> 17

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador de GAPDH  
 <400> 17  
 cttcaccacc atggagaagg20  
 10 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador de GAPDH  
 <400> 18  
 20 tgaagtcgca ggagacaacc 20  
 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador con sentido  
 30 <400> 19  
 atgccggccc acatgctcca agag 24  
 <210> 20  
 <211> 27  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador antisentido  
 40 <400> 20  
 tcagctactc ttgtgactcc cgtctcc 27  
 <210> 21  
 <211> 5108  
 <212> ADN  
 <213> *Bos taurus*  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (145)..(1224)  
 <223>  
 <400> 21  
 55

ES 2 589 706 T3

tcgacgggaa ggtcccgagc gcagcgctgc ggatcccac gcaaaagcag gctcaggaac	60
tagtctacac tcagtttga ctgccccgaa ctccgctccg cagtctcagc cccgagaaag	120
tgatcccagt gtctgagagc ccag atg ccg gcc cac ttg ctg caa gag gag	171
Met Pro Ala His Leu Leu Gln Glu Glu	
1 5	
atc tot agc tcc tac aca acc acc acc acc atc aca gca cct cct tcc	219
Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr Thr Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser	
10 15 20 25	
agg gtc ctg cag aat gga ggg ggc aaa ttg gag aag act ccc cta tac	267
Arg Val Leu Gln Asn Gly Gly Gly Lys Leu Glu Lys Thr Pro Leu Tyr	
30 35 40	
ttg gaa gaa gac atc cgc cct gaa atg aga gat gac atc tat gac cca	315
Leu Glu Glu Asp Ile Arg Pro Glu Met Arg Asp Asp Ile Tyr Asp Pro	
45 50 55	
act tac cag gat aag gag ggc cca aag ccc aag ctt gag tat gtt tgg	363
Thr Tyr Gln Asp Lys Glu Gly Pro Lys Pro Lys Leu Glu Tyr Val Trp	
60 65 70	
aga aac atc atc ctc atg tct ctg tta cac ttg gga gcc cta tat ggg	411
Arg Asn Ile Ile Leu Met Ser Leu Leu His Leu Gly Ala Leu Tyr Gly	
75 80 85	
atc aca ttg atc ccc acc tgc aag ata tac acc tat atc tgg gtg tta	459
Ile Thr Leu Ile Pro Thr Cys Lys Ile Tyr Thr Tyr Ile Trp Val Leu	
90 95 100 105	
ttc tac tat ctg atg ggt gcc ctg ggc atc aca gca ggg gcc cat cgc	507
Phe Tyr Tyr Leu Met Gly Ala Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg	
110 115 120	
ctg tgg agt cac cga acc tac aaa gct cgg ctg cct ctg cgg gtc ttc	555
Leu Trp Ser His Arg Thr Tyr Lys Ala Arg Leu Pro Leu Arg Val Phe	
125 130 135	
ctg atc att ggc aac acc atg gcg ttc cag aat gac gtt ttt gaa tgg	603
Leu Ile Ile Gly Asn Thr Met Ala Phe Gln Asn Asp Val Phe Glu Trp	
140 145 150	
tcc cga gat cac cgt gcc cac cac aag ttt tca gaa acg gat gcc gac	651
Ser Arg Asp His Arg Ala His His Lys Phe Ser Glu Thr Asp Ala Asp	
155 160 165	
ccc cac aat tcc cga cgt ggc ttt ttc ttc tct cac gtg ggt tgg ctg	699
Pro His Asn Ser Arg Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Val Gly Trp Leu	
170 175 180 185	

ES 2 589 706 T3

ctt gtg cgc aaa cac cca gct gtc aaa gaa aag ggt tcc acg cta aat	747
Leu Val Arg Lys His Pro Ala Val Lys Glu Lys Gly Ser Thr Leu Asn	
190 195 200	
tta tcc gac cta aga gcc gag aag ctg gtg atg ttc cag agg agg tac	795
Leu Ser Asp Leu Arg Ala Glu Lys Leu Val Met Phe Gln Arg Arg Tyr	
205 210 215	
tac aaa cct ggt gtc ctg ttg ttg tgc ttc atc ctg ccc aca ctc gtg	843
Tyr Lys Pro Gly Val Leu Leu Leu Cys Phe Ile Leu Pro Thr Leu Val	
220 225 230	
cca tgg tat ctg tgg gat gaa acg ttt caa aac agc ctg ttt ttt gcc	891
Pro Trp Tyr Leu Trp Asp Glu Thr Phe Gln Asn Ser Leu Phe Phe Ala	
235 240 245	
acc tta ttc cgt tat gcc ctt ggg ctc aac gtc acc tgg ctg gtg aat	939
Thr Leu Phe Arg Tyr Ala Leu Gly Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn	
250 255 260 265	
agt gct gcc cat atg tat gga tac cgc cct tat gac aag acc atc aac	987
Ser Ala Ala His Met Tyr Gly Tyr Arg Pro Tyr Asp Lys Thr Ile Asn	
270 275 280	
ccc cga gag aat att ctg gtt tcc ctg gga gct gcg ggt gag ggc ttc	1035
Pro Arg Glu Asn Ile Leu Val Ser Leu Gly Ala Ala Gly Glu Gly Phe	
285 290 295	
cac aac tac cac cac acc ttt cct tat gac tac tca gcc agt gag tac	1083
His Asn Tyr His His Thr Phe Pro Tyr Asp Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr	
300 305 310	
cgc tgg cac atc aac ttt acc acg ttc ttc att gat tgc atg gct gcc	1131
Arg Trp His Ile Asn Phe Thr Thr Phe Phe Ile Asp Cys Met Ala Ala	
315 320 325	
atc ggt ctg gct tat gac cgg aag aaa gta tcc aag gct gcc atc ttg	1179
Ile Gly Leu Ala Tyr Asp Arg Lys Lys Val Ser Lys Ala Ala Ile Leu	
330 335 340 345	
gcc agg ata aaa aga act gga gag gaa agc tac aag agt ggc tga	1224
Ala Arg Ile Lys Arg Thr Gly Glu Glu Ser Tyr Lys Ser Gly	
350 355	
atttgtggtc ccttggttc cttttccaaa agccatctgg gcagaggttt aatgttctgt	1284
ttattaacta ctgaataatg ctaccaggat gctaaagatg acgttaaccc attacagtac	1344
agtattcttt aaaattttct ttttaaattg aaagccaaca actctgcctt tatgatgcta	1404
agctcatggt cttatttctt ctccatcttt ctttctcttc tgttccatt atccttccct	1464
ttgttttgtc cctgtcacct tcctttctcc ttctctctcat tgccccccag gcaagcaggt	1524
ggtcagtcac tgggtgggttt ccagcttcca aagcctagac aaccctgctg tagtctcaaa	1584
ctagtggctt ttgccccggc tgacccttcc cttgagctgt ctgagcttta aggtggatgg	1644
ctcaagctag agatatgaca gaatcttctg ggaagggcct tgatgatctt cagcccagac	1704
ttttgctaaa tgaaatggaa aaataacttt attttggcac caaactgaaa aaacaggtca	1764
attgtcaggg gagagagtca gcatgcatgg tgtgattgat aataggatg agttgaagtg	1824

ES 2 589 706 T3

ggaaacaagg caggaagctc ctgctgtgat cagacacccc tgtctgccc tccccagta 1884  
 tgctcccttt ctctcctgac tctgggaaat atctgtggag cagggcagtc ctaaaactca 1944  
 aaagcaaadc tcaatgtcct gatatacttt aggcttagga taaagaagaa gcatttagtt 2004  
 tgtggtaaaa gtggtctctg ctgcagacga attgttttct ttctttcaca acaggaagat 2064  
 ttcttattct agataacaag aaatottgag gttggttatt tccagaattg ctgattccag 2124  
 cagctcagga aattgtcaaa attctttcat cttctactc tgccatcttg gggatattgg 2184  
 tcagctcccc tcatagtaag aagatggcta cagcattttg agacttcaaa aagagataca 2244  
 ttggtggtat ggtggtgagc atagctgctt cccaaaaaag aaagaatttt aggagccaga 2304  
 gttgggtcaa acataaagct atatatacat gggacttttg gttggaatat taaagtaatt 2364  
 ctcttagagt atttccctct gaaagagagg gggcttgaag aagaggaaga attagccagg 2424  
 ttgcctcctt tcctctcctt gctggacagg agatggagag gttgaggggc agggctctgta 2484  
 ggcagttcct aagagatagg gttacaaaag aaaggctctg agatcacatt gctgggggat 2544  
 tcagaagggt actgagtaag ttggtgggtg tcctgatata gaagctgggt atacaaacaa 2604  
 gttagatggt gggttcattt cattaattcc actttctcct tggattgaga aagcattaga 2664  
 aggtttctcc ccacggtggt gaacctttc actcattcct tctattacct tctagcggaa 2724  
 aatacaggac tggctggggg atgggtagg aatctctcaa ctacctatc aattcttggc 2784  
 tctgccatct ttgtccactt tctcctgctg gttttatctc cttgacgttt ccttctttt 2844  
 ctggacaggg aagcctcttc tgtgtgtatt cagagggcagt gatggctact gcggtccaag 2904  
 tcgttccctc tcttactgac agaatggtca gggctactga accactgttt ctctttacaa 2964  
 agttgagcaa gctgccactt tcaactggcc tccagagtct ccatctatat ccttgtgctc 3024  
 cttaccacac tgatgactcc agacaaggct ggcaaagcct gctagaaaca tcctgggcac 3084  
 aggcatctgc actcatgagg cacggccaag ccgaatgctc atgttgtgcc agagccagcc 3144  
 atggagcaaa agaggatttg ttttagtct cctctgtctg ggtcagaacc agagagcatg 3204  
 ctggatgccc cggcttact ggataagctg cctacctga gtcagtgctc ccagcggaca 3264  
 gtgagaggct tgcagaagca gggggtgctt agccttact ggggaagcaca agaagcaaag 3324  
 gcaggttcca aagtgcctca ctcagaaggc ggcccagcc ccctggaggg agccaggtg 3384  
 taccgcaaga ccttgactga ggcttaggat gtgagatgcc atgaacttg ctgaacagtg 3444  
 tctctgttca gcaaaactaac cagcattccc cacaacacag tctagggcag acgatagtat 3504  
 agaggagtgt tggaagaacc ttgggtccct ttgtccctgt aacctcagtt gtctaggcag 3564  
 aaacctggct ttattctatt taaaggttga aaatatacaa taccaaatgc tctgccactg 3624  
 ttgagctcca aggatggaaa ggaggagaac atttcttctt gtattaattg gatagatgga 3684

ggctacagag cttaggctaa actaaaggca tccttgtctt ttgagttggt cctctcagta 3744  
 ggaaaaaaaa aaaatctaataat ggaagatcac tgtagattag atcctctgac caagcaccta 3804  
 ccgcttggaa atgcctgtgg ggtagtttta attccacagg tcatcagatg catgctttac 3864  
 aactgatgat caaaaccaac ttatctttct attctaattg tgttcogtgg atctgatcta 3924  
 taccatgacc ctacacaagg ctggatggtg tccttggggc cagggtaact gtacttgtgt 3984  
 aggtgggggt tgtctaotga gtaaggaata ctgtttttaa ggttctaaag ctaaattcaa 4044  
 atgatgcatt aatgacccaa aaactcagat ctgatggtgt ctgaatttct aacagtcctt 4104  
 gctttgtggg tatgctgaca acttatctgg atgccttaca tcttttctaa acagtgttgc 4164  
 ctctgaacgt gctctgctcc ctccctgctc cctcttttga gccctttgc accccagagc 4224  
 ctgcagaagt ggctggtata aaagggggcc tggctagaga atgatcagtg tagctgtttg 4284  
 caggattcct ttctgggctt cattttggaa actttgctta gggctatttt tcttaattgc 4344  
 ccacatttga tggagggtag aaggaatttt gaatgtattt gatttattat tattattttt 4404  
 ttttttttag attaaaggat ggttgtagca tttaaaatgg aaatttttcc tcctggtag 4464  
 ctagtatcct gagtgtatc tctgtaagtg tagctcaaat gggcctcat gaaaagttca 4524  
 agaaagctcg atgtcaaagt tatatgggtg gttaaggcca gggcctgtcc taccactgtg 4584  
 ccaactgactt gctatgtgac cctgggcaag tcatttaact ataatgtgcc tcagttttcc 4644  
 ttctgttaaa atgggataat aatactgacc tacctcaaag ggcagttttg aggcattgact 4704  
 aatgcttttt ataaagcatc ttggaattct ctttaagttct gagtattttt atagtagcag 4764  
 tatccaccat gaagtgtgtc caccacgagc cacgtgtcct ggatgccgtc aggaatctat 4824  
 atggttctct ctgagagatg gaataaatgc atcagataaa ggggtggataa ctagccggac 4884  
 aaaatctgag aatgcataaa ctcaattgcca tggaaacata cacaggatac cttttcctta 4944  
 attgggtggg atttttccct ttttatgtgg gatagtagtt atttgtgacc taagaataat 5004  
 tttggaataa tttctattaa tatcaactcc aaagctagtt gtactgatct gagattgtgt 5064  
 ttgttcataa taaaagtga totgattgcc ctgaaaaaaaa aaaa 5108

<210> 22  
 <211> 359  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<400> 22

Met Pro Ala His Leu Leu Gln Glu Glu Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser Arg Val Leu Gln Asn Gly Gly  
 20 25 30

5

10

ES 2 589 706 T3

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

ES 2 589 706 T3

Ser Leu Gly Ala Ala Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr Phe  
 290 295 300

Pro Tyr Asp Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Thr  
 305 310 315 320

Thr Phe Phe Ile Asp Cys Met Ala Ala Ile Gly Leu Ala Tyr Asp Arg  
 325 330 335

Lys Lys Val Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Arg Ile Lys Arg Thr Gly  
 340 345 350

Glu Glu Ser Tyr Lys Ser Gly  
 355

<210> 23  
 <211> 1080  
 <212> ADN  
 <213> *Equus caballus*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1080)  
 <223>

<400> 23

atg ccg gcc cat ttg ctg caa gag gag atc tct agc tcc tac act acc	48
Met Pro Ala His Leu Leu Gln Glu Glu Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr	
1 5 10 15	
acc acc acc atc aca gcg cct ccc tcc agg gtc ctg cag aat gga gga	96
Thr Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser Arg Val Leu Gln Asn Gly Gly	
20 25 30	
ggc aag ttg gag aag act tcc cca tac ttg gaa gaa gac atc cgc cct	144
Gly Lys Leu Glu Lys Thr Ser Pro Tyr Leu Glu Glu Asp Ile Arg Pro	
35 40 45	
gaa atg aaa gaa gac ctc tat gac ccg agc tac cgg gat aag gag ggc	192
Glu Met Lys Glu Asp Leu Tyr Asp Pro Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Gly	
50 55 60	
cca aag ccc aag ttt cag tat gtt tgg aga aac atc atc ctt atg tct	240
Pro Lys Pro Lys Phe Gln Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Met Ser	
65 70 75 80	
ctg cta cac gtg gga gcc ctg tat ggg atc cta ctg ttc ccc agc tgc	288
Leu Leu His Val Gly Ala Leu Tyr Gly Ile Leu Leu Phe Pro Ser Cys	
85 90 95	
aag atc tac acc tac ctc tgg gtg gct ttc tac tat ttc acc agt gcc	336
Lys Ile Tyr Thr Tyr Leu Trp Val Ala Phe Tyr Tyr Phe Thr Ser Ala	
100 105 110	
ctt ggc gta acg gca gga gcg cat cgc ctg tgg agc cac cgg act tac	384
Leu Gly Val Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Thr Tyr	

5

10

15

ES 2 589 706 T3

115	120	125	
aaa gct cgg ctg occ ctg cgt ctc ttc ctg atc att gcc aac acg atg			432
Lys Ala Arg Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu Ile Ile Ala Asn Thr Met			
130	135	140	
gcc ttc cag aat gac att ttt gaa tgg gcc cga gat cac cgt gtc cac			480
Ala Phe Gln Asn Asp Ile Phe Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Val His			
145	150	155	160
cac aag ttt tca gaa aca gat gct gat ccc cac aat gcc cga cgt ggc			528
His Lys Phe Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Arg Arg Gly			
165	170	175	
ttt ttc ttc tct cac gtg ggt tgg ctg ctt gtg cgc aaa cac cca gca			576
Phe Phe Phe Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Ala			
180	185	190	
gtc aaa gag aaa ggt gct ttg cta gag tta tct gac cta aaa gcc gag			624
Val Lys Glu Lys Gly Ala Leu Leu Glu Leu Ser Asp Leu Lys Ala Glu			
195	200	205	
aag ctg gtg atg ttc cag agg agg tac tac aaa ccc ggt gtc gtg ttg			672
Lys Leu Val Met Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Val Val Leu			
210	215	220	
ctg tgc ttc atc ctg ccc aca ctt gtg ccc tgg tat ttc tgg ggt gaa			720
Leu Cys Phe Ile Leu Pro Thr Leu Val Pro Trp Tyr Phe Trp Gly Glu			
225	230	235	240
act ttt cca cac agc tta ttt gtc gcc act ttg ttg cgt tac gct ctt			768
Thr Phe Pro His Ser Leu Phe Val Ala Thr Leu Leu Arg Tyr Ala Leu			
245	250	255	
gtg ctc aat gtc act tgg ctg gtg aac agt gct gcc cac ctc tac gga			816
Val Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Tyr Gly			
260	265	270	
tat cgt cct tac gac aag acc att aac ccc cga gag aat atc ctg gtt			864
Tyr Arg Pro Tyr Asp Lys Thr Ile Asn Pro Arg Glu Asn Ile Leu Val			
275	280	285	
tca ctg gga gct gtg ggt gag ggc ttc cac aac tac cac cac toc ttt			912
Ser Leu Gly Ala Val Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Ser Phe			
290	295	300	
ccc tat gac tac tct gcc agt gag tac cgc tgg cac atc aac ttt acc			960
Pro Tyr Asp Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Thr			
305	310	315	320
aca ttc ttc atc gat tgc atg gct gtc ctc ggt ttg gct tat gac cgg			1008
Thr Phe Phe Ile Asp Cys Met Ala Val Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Arg			
325	330	335	
aag aaa gta tcc aag gct gcc atc ttg gcc aag att aaa aga act gga			1056
Lys Lys Val Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Lys Ile Lys Arg Thr Gly			
340	345	350	
gat gaa acc tac aag agt ggc tga			1080
Asp Glu Thr Tyr Lys Ser Gly			
355			

<210> 24  
 <211> 359  
 <212> PRT

ES 2 589 706 T3

<213> *Equus caballus*

<400> 24

Met Pro Ala His Leu Leu Gln Glu Glu Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Ser Arg Val Leu Gln Asn Gly Gly  
 20 25 30

Gly Lys Leu Glu Lys Thr Ser Pro Tyr Leu Glu Glu Asp Ile Arg Pro  
 35 40 45

Glu Met Lys Glu Asp Leu Tyr Asp Pro Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Gly  
 50 55 60

Pro Lys Pro Lys Phe Gln Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Met Ser  
 65 70 75 80

Leu Leu His Val Gly Ala Leu Tyr Gly Ile Leu Leu Phe Pro Ser Cys  
 85 90 95

Lys Ile Tyr Thr Tyr Leu Trp Val Ala Phe Tyr Tyr Phe Thr Ser Ala  
 100 105 110

Leu Gly Val Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Thr Tyr  
 115 120 125

Lys Ala Arg Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu Ile Ile Ala Asn Thr Met  
 130 135 140

Ala Phe Gln Asn Asp Ile Phe Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Val His  
 145 150 155 160

His Lys Phe Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Arg Arg Gly  
 165 170 175

Phe Phe Phe Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Ala  
 180 185 190

Val Lys Glu Lys Gly Ala Leu Leu Glu Leu Ser Asp Leu Lys Ala Glu  
 195 200 205

Lys Leu Val Met Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Val Val Leu  
 210 215 220

ES 2 589 706 T3

Leu Cys Phe Ile Leu Pro Thr Leu Val Pro Trp Tyr Phe Trp Gly Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Phe Pro His Ser Leu Phe Val Ala Thr Leu Leu Arg Tyr Ala Leu  
 245 250 255  
 Val Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Tyr Gly  
 260 265 270  
 Tyr Arg Pro Tyr Asp Lys Thr Ile Asn Pro Arg Glu Asn Ile Leu Val  
 275 280 285  
 Ser Leu Gly Ala Val Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Ser Phe  
 290 295 300  
 Pro Tyr Asp Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Thr  
 305 310 315 320  
 Thr Phe Phe Ile Asp Cys Met Ala Val Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Arg  
 325 330 335  
 Lys Lys Val Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Lys Ile Lys Arg Thr Gly  
 340 345 350  
 Asp Glu Thr Tyr Lys Ser Gly  
 355

5 <210> 25  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador con sentido  
 <400> 25  
 cccggaattc atgccggccc acttgctgca gg 32  
 15 <210> 26  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador antisentido  
 <400> 26  
 ccgcccctcg agtcagccac tcttgtagtt tccatctccg gttc 44  
 25 <210> 27  
 <211> 491  
 <212> PRT  
 <213> *Megathura crenulata*  
 30 <400> 27

ES 2 589 706 T3

Ile Leu Val Arg Lys Asn Ile His Ser Leu Ser His His Glu Ala Glu  
1 5 10 15

Glu Leu Arg Asp Ala Leu Tyr Lys Leu Gln Asn Asp Glu Ser His Gly  
20 25 30

Gly Tyr Glu His Ile Ala Gly Phe His Gly Tyr Pro Asn Leu Cys Pro  
35 40 45

Glu Lys Gly Asp Glu Lys Tyr Pro Cys Cys Val His Gly Met Ser Ile  
50 55 60

Phe Pro His Trp His Arg Leu His Thr Ile Gln Phe Glu Arg Ala Leu  
65 70 75 80

Lys Lys His Gly Ser His Leu Gly Ile Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Gln  
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Pro Thr Phe Phe Ala Asp Ser Gly Asn Asn Asn  
100 105 110

Pro Phe Phe Lys Tyr His Ile Arg Ser Ile Asn Gln Asp Thr Val Arg  
115 120 125

Asp Val Asn Glu Ala Ile Phe Gln Gln Thr Lys Phe Gly Glu Phe Ser  
130 135 140

Ser Ile Phe Tyr Leu Ala Leu Gln Ala Leu Glu Glu Asp Asn Tyr Cys  
145 150 155 160

Asp Phe Glu Val Gln Tyr Glu Ile Leu His Asn Glu Val His Ala Leu  
165 170 175

Ile Gly Gly Ala Glu Lys Tyr Ser Met Ser Thr Leu Glu Tyr Ser Ala  
180 185 190

Phe Asp Pro Tyr Phe Met Ile His His Ala Ser Leu Asp Lys Ile Trp  
195 200 205

Ile Ile Trp Gln Glu Leu Gln Lys Arg Arg Val Lys Pro Ala His Ala  
210 215 220

Gly Ser Cys Ala Gly Asp Ile Met His Val Pro Leu His Pro Phe Asn  
225 230 235 240

ES 2 589 706 T3

Tyr Glu Ser Val Asn Asn Asp Asp Phe Thr Arg Glu Asn Ser Leu Pro  
 245 250 255  
 Asn Ala Val Val Asp Ser His Arg Phe Asn Tyr Lys Tyr Asp Asn Leu  
 260 265 270  
 Asn Leu His Gly His Asn Ile Glu Glu Leu Glu Glu Val Leu Arg Ser  
 275 280 285  
 Leu Arg Leu Lys Ser Arg Val Phe Ala Gly Phe Val Leu Ser Gly Ile  
 290 295 300  
 Arg Thr Thr Ala Val Val Lys Val Tyr Ile Lys Ser Gly Thr Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Asp Glu Tyr Ala Gly Ser Phe Val Ile Leu Gly Gly Ala Lys Glu  
 325 330 335  
 Met Pro Trp Ala Tyr Glu Arg Leu Tyr Arg Phe Asp Ile Thr Glu Thr  
 340 345 350  
 Val His Asn Leu Asn Leu Thr Asp Asp His Val Lys Phe Arg Phe Asp  
 355 360 365  
 Leu Lys Lys Tyr Asp His Thr Glu Leu Asp Ala Ser Val Leu Pro Ala  
 370 375 380  
 Pro Ile Ile Val Arg Arg Pro Asn Asn Ala Val Phe Asp Ile Ile Glu  
 385 390 395 400  
 Ile Pro Ile Gly Lys Asp Val Asn Leu Pro Pro Lys Val Val Val Lys  
 405 410 415  
 Arg Gly Thr Lys Ile Met Phe Met Ser Val Asp Glu Ala Val Thr Thr  
 420 425 430  
 Pro Met Leu Asn Leu Gly Ser Tyr Thr Ala Met Phe Lys Cys Lys Val  
 435 440 445  
 Pro Pro Phe Ser Phe His Ala Phe Glu Leu Gly Lys Met Tyr Ser Val  
 450 455 460  
 Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Met Thr Ala Ser Thr Thr Glu Leu Cys Asn  
 465 470 475 480  
 Asp Asn Asn Leu Arg Ile His Val His Val Asp  
 485 490

REIVINDICACIONES

1. Un agente inductor de inmunidad para su uso en un método de tratamiento médico o veterinario, comprendiendo el agente inductor de inmunidad, como principio o principios activos eficaces, al menos un polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad seleccionado de los polipéptidos (a) y (b), a continuación:
- (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 2, 22 y 24;
- (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia no inferior al 85 % con el polipéptido (a).
2. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 2, 22 o 24.
3. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el método comprende administrar a un paciente
- (i) el polipéptido,
- (ii) un linfocito T citotóxico que se une selectivamente a un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporado en una molécula de MHC, y/o
- (iii) una célula presentadora de antígeno que presenta en su superficie un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporados en una molécula de MHC.
4. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con una cualquiera las reivindicaciones 1-3, que es para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer o cánceres.
5. Un agente inductor de inmunidad para su uso en un método de tratamiento médico o veterinario, comprendiendo el agente inductor de inmunidad como ingrediente o ingredientes eficaces un vector o vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican al menos un polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad seleccionado de los polipéptidos (a) y (b) a continuación, siendo dichos vector o vectores recombinantes capaces de expresar *in vivo* dicho polipéptido o polipéptidos:
- (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 2, 22 y 24;
- (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 % con el polipéptido (a); en donde el agente inductor de inmunidad es para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer o cánceres.
6. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 2, 22 o 24.
7. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en donde el método comprende administrar a un paciente
- (i) el vector,
- (ii) un linfocito T citotóxico que se une selectivamente a un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporado en una molécula de MHC, y/o
- (iii) una célula presentadora de antígeno que presenta en su superficie un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporados en una molécula de MHC.
8. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que dichos cáncer o cánceres son cánceres que expresan SCD1.
9. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde dichos cáncer o cánceres son cáncer de mama, tumor cerebral, cáncer de colon, adenocarcinoma perianal, neuroblastoma, mastocitoma, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y/o leucemia.
10. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además un agente potenciador inmunitario.
11. El agente inductor de inmunidad para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho agente potenciador inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en adyuvante incompleto de Freund, Montanide, poli-I:C y derivados del mismo, oligonucleótidos CpG, interleucina-12, interleucina-18, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\omega$ , interferón- $\gamma$  y ligando de Flt3.
12. Un método *in vitro* para preparar una célula presentadora de antígeno que presenta en su superficie un complejo

que comprende al menos un polipéptido que tiene actividad inductora de inmunidad derivada de los polipéptidos (a) y (b) a continuación incorporado a una molécula de MHC, comprendiendo el método poner en contacto la célula presentadora de antígeno con dicho al menos un polipéptido seleccionado de:

- 5
- (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 2, 22 o 24; y
  - (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia no inferior al 85 % con el polipéptido (a).
- 10
13. Un método *in vitro* para preparar un linfocito T citotóxico que se une de forma selectiva a un complejo que comprende al menos un polipéptido (a) o (b) de acuerdo con la reivindicación 12 incorporado en una molécula de MHC, comprendiendo el procedimiento:
- 15
- cocultivar una célula presentadora de antígeno preparada de acuerdo con el método de la reivindicación 12 con al menos un linfocito T, y
  - permitir que el al menos un linfocito T proliferare.
- 20
14. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 13, en el que se usa la proporción de células presentadoras de antígeno:linfocitos T de 1:1 a 1:100, opcionalmente en el que el cultivo se lleva a cabo en presencia de IL-2, IL-6, IL -7 y/o IL-12.

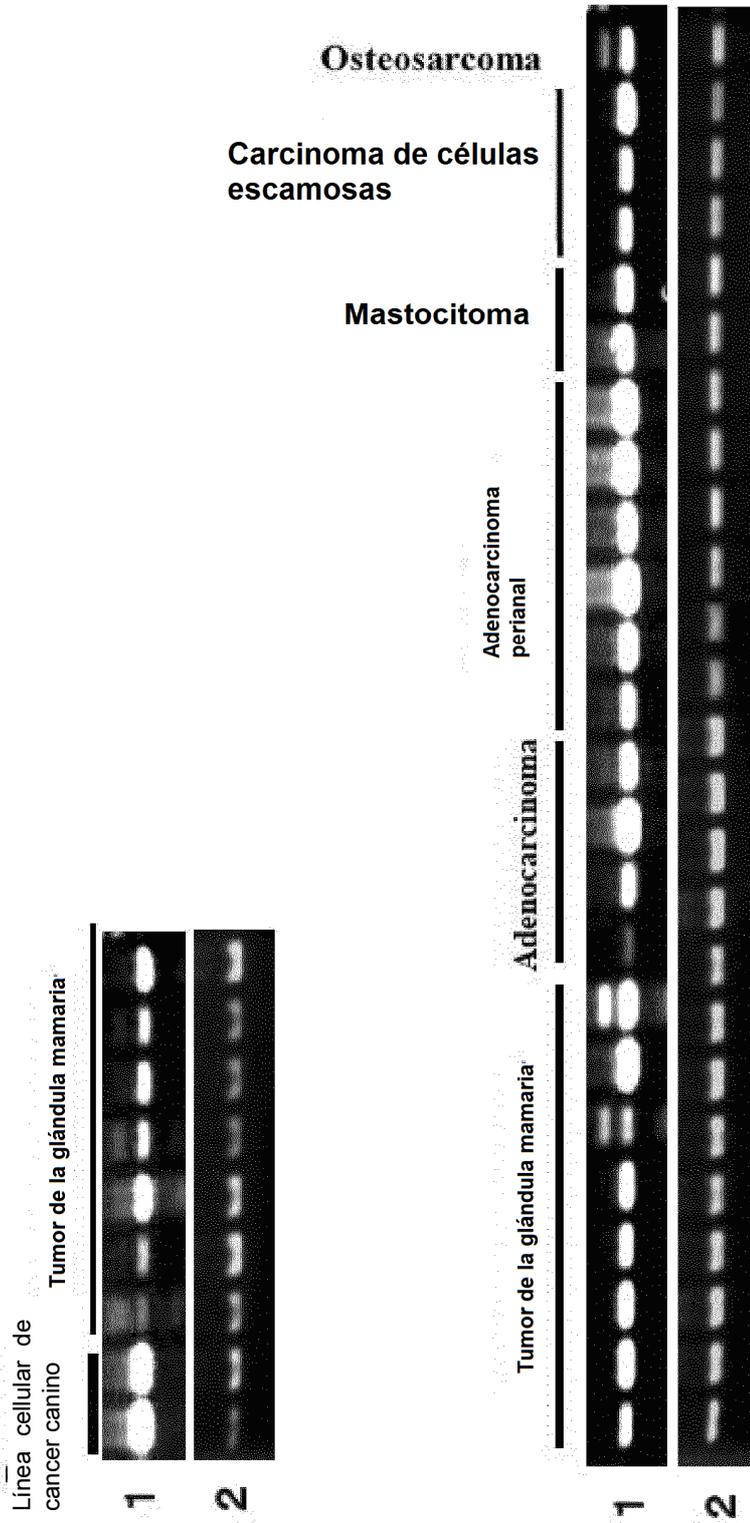
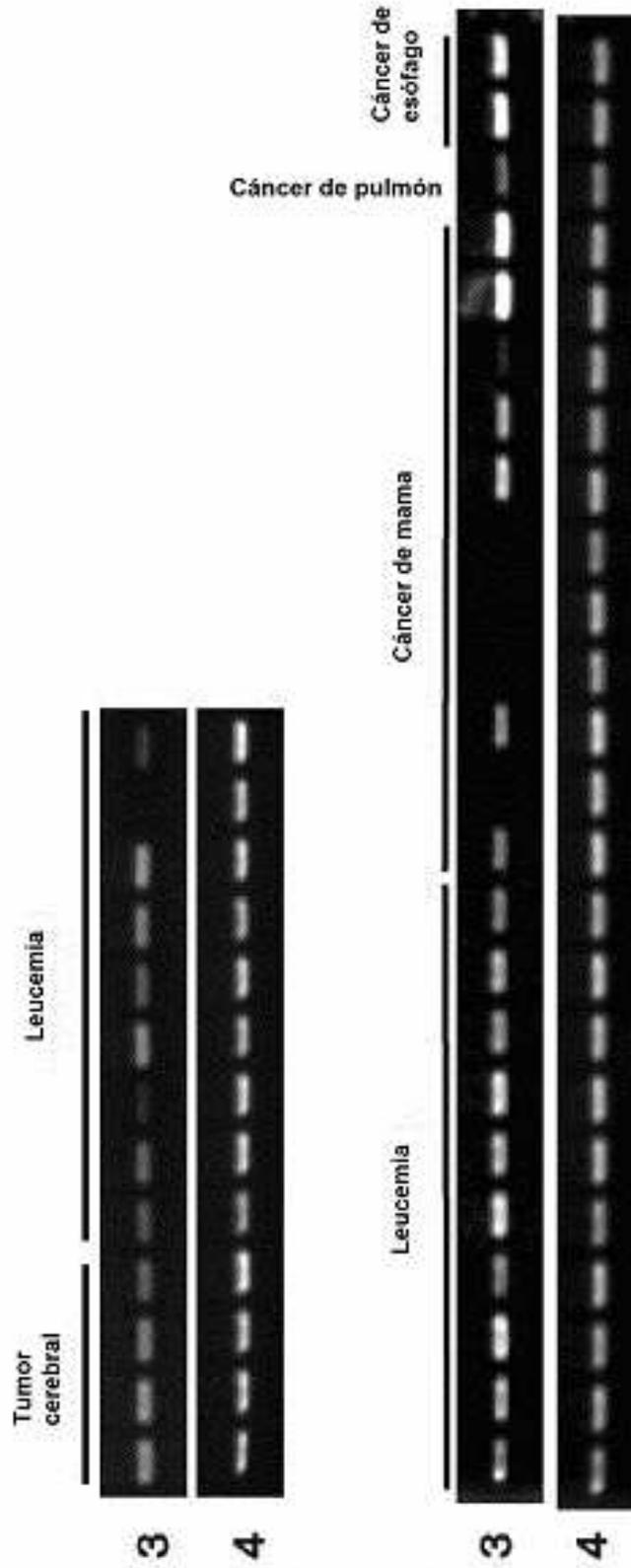
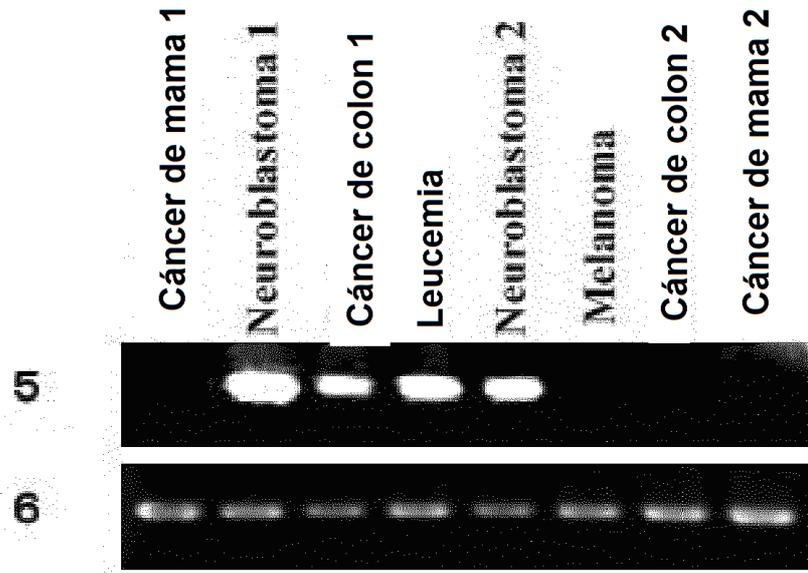


Fig.1



**Fig. 2**



**Fig.3**