

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 161**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01) C12N 15/09	(2006.01)
A61K 35/76	(2015.01)	
A61K 38/21	(2006.01)	
A61K 39/39	(2006.01)	
A61K 45/00	(2006.01)	
A61K 48/00	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 35/02	(2006.01)	
A61P 37/04	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2012** **PCT/JP2012/062750**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012** **WO12157737**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2012** **E 12784927 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016** **EP 2711017**

54 Título: **Agente inmunoinductor**

30 Prioridad:

19.05.2011 JP 2011112181

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

28.12.2016

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 2 595 161 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 inmunoadyuvante

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con un novedoso agente inmunoadyuvante útil como agente terapéutico y/o profiláctico para el cáncer.

10 Técnica antecedente

El cáncer es la causa de muerte más común entre todas las causas de muerte y las terapias que se llevan a cabo para éste por el momento son principalmente el tratamiento quirúrgico, el cual puede llevarse a cabo en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. A pesar de los desarrollos de nuevos métodos quirúrgicos y del descubrimiento de nuevos agentes anticancerígenos en los últimos años, los resultados del tratamiento de los cánceres no han mejorado mucho hasta ahora, excepto para algunos cánceres. En los últimos años, gracias al desarrollo en la biología molecular y en la inmunología del cáncer, se identificaron antígenos cancerígenos reconocidos por linfocitos T citotóxicos que reaccionan con los cánceres, así como los genes que codifican los antígenos cancerígenos, y han aumentado las expectativas de las inmunoterapias específicas de antígeno.

En inmunoterapia, a fin de reducir efectos secundarios, es necesario que el péptido o la proteína que han de reconocerse como antígeno apenas estén presentes en las células normales y estén presentes de forma específica en las células cancerígenas. En 1991, Boon et al, del Instituto Ludwig de Bélgica aislaron un antígeno de melanoma humano MAGE 1, que es reconocido por linfocitos T CD8 positivos, mediante un método de clonación de expresión de ADNc usando una línea celular de cáncer autóloga y linfocitos T reactivos al cáncer (documento no de patente 1). A partir de ahí, se publicó el método SEREX (identificaciones serológicas mediante clonación de expresión recombinante), en el que los antígenos tumorales reconocidos por anticuerpos producidos en el organismo vivo de un paciente con cáncer en respuesta al propio cáncer del paciente se identifican mediante la aplicación de un método de colación de expresión génica (documento de patente 1, documento no de patente 2), y se han aislado varios antígenos de cáncer mediante este método. Han comenzado ensayos clínicos para inmunoterapia de cáncer usando una parte de los antígenos de cáncer como dianas.

Por otra parte, al igual que en los seres humanos, se conocen una serie de tumores tales como tumor de glándula mamaria y carcinoma epidermoide en perros y gatos y también varían mucho en las estadísticas de enfermedades en perros y gatos. Sin embargo, no existe por el momento ningún agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico eficaz para los cánceres en perros y gatos. Como los dueños perciben la mayoría de los tumores de perros y gatos sólo cuando han aumentado debido a su avance, su visita al hospital ya es demasiado tarde y, aun cuando reciban escisión quirúrgica o administración de un fármaco humano (un fármaco anticancerígeno o similar), suelen morir poco después del tratamiento. En dichas circunstancias, si llegan a estar disponibles agentes terapéuticos y agentes profilácticos para el cáncer, eficaces para perros y gatos, se espera que se desarrollen sus usos para los cánceres de perros.

La subunidad A de tipo 1 de p60 de katanina (KATNAL1, por sus siglas en inglés) se identificó como una proteína que tiene un dominio de unión a microtúbulo (documento de patente 2, documento no de patente 3). Sin embargo, no hay comunicaciones que sugieran que la proteína KATNAL1 tenga actividad inductora de la inmunidad contra células cancerígenas y, por tanto, que la proteína sea útil para el tratamiento o profilaxis del cáncer.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

[Documento de patente 1] US 5698396 B
[Documento de patente 2] JP 2004-8216 A

Documentos no de patente

[Documento no de patente 1] Bruggen P. et al., Science, 254: 1643-1647 (1991)
[Documento no de patente 2] Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 92: 11810-11813
(1995) [Documento no de patente 3] Rigden DJ. et al., FEBS Lett., 4 de marzo; 583(5): 872-8 (2009)

60 Sumario de la invención**Problemas para resolver mediante la invención**

La presente invención se propone descubrir un polipéptido novedoso útil para ser un agente terapéutico y/o profiláctico para el cáncer y proporcionar el polipéptido para su uso en un agente inductor de la inmunidad.

Medios para resolver los problemas

Mediante el método SEREX, usando una biblioteca de ADNc procedente de testículo de perro y suero obtenido de un perro portador de un tumor, los presentes inventores estudiaron exhaustivamente para obtener un ADNc que codifica una proteína que se une a anticuerpos presentes en suero procedente de un organismo vivo portador de tumor y, basándose en el ADNc, se preparó un polipéptido de subunidad A de tipo 1 de p60 de katanina (de aquí en adelante denominada como KATNAL1) de perro que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2. Además, basándose en genes homólogos humano y ratón del gen obtenido, se prepararon KATNAL1 humano y de ratón que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:4 y 6. Además, los presentes inventores descubrieron que estos polipéptidos de KATNAL1 se expresan de forma específica en tejidos o células de cáncer de mama, tumor cerebral, adenocarcinoma perianal, neuroblastoma, mastocitoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides y leucemia. Los presentes inventores descubrieron además que la administración del KATNAL1 a un organismo vivo posibilita la inducción de inmunocitos contra KATNAL1 en el organismo vivo y la regresión de un tumor que expresa KATNAL1 en el organismo vivo. Además, los presentes inventores descubrieron que un vector recombinante que puede expresar un polinucleótido que codifica el polipéptido de KATNAL1 o un fragmento del mismo induce un efecto antitumoral contra el cáncer que expresa KATNAL1 en un organismo vivo.

Además, los presentes inventores descubrieron que un polipéptido de KATNAL1 tiene una capacidad de ser presentado por células presentadoras de antígeno para causar activación y el crecimiento de linfocitos T citotóxicos específicos para el péptido (actividad inmunoinductora) y, por 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 han entrado en contacto con el polipéptido y los linfocitos T que han entrado en contacto con las células presentadoras de antígeno son útiles para terapia y/o profilaxis del cáncer, completando de esa forma la presente invención.

Por tanto, la presente invención tiene las siguientes características:

(1) Un agente inmunoinductor para su uso en un método de tratamiento médico o veterinario, comprendiendo el agente inmunoinductor como principio(s) eficaz(es) al menos un polipéptido que tiene actividad inmunoinductora seleccionado de entre los polipéptidos (a) a (b) más adelante, y/o un(os) vector(es) recombinante(s) que comprende(n) un(os) polinucleótido(s) que codifica(n) el al menos un polipéptido, el(los) vector(es) recombinante(s) que son capaces de expresar el(los) polipéptido(s) *in vivo*:

- (a) un polipéptido que tiene secuencias de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 2, 8, 10 y 12;
- (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de no menos del 85 % con el polipéptido (a).

(2) El agente inmunoinductor para su uso de acuerdo con 1, en el que el polipéptido que tiene actividad inmunoinductora es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:4, 2, 8, 10 o 12.

(3) El agente inmunoinductor para su uso de acuerdo con (1) o (2), en el que el método comprende administrar a un paciente (i) el polipéptido o vector, (ii) un linfocito T citotóxico que se une de forma selectiva a un complejo que comprende al menos uno de dicho polipéptido incorporado dentro de una molécula de MHC y/o (iii) una célula presentadora de antígeno que presenta sobre su superficie un complejo que comprende al menos uno de dicho polipéptido incorporado dentro de una molécula de MHC.

(4) El agente inmunoinductor para su uso de acuerdo con (1)-(3), el cual es para su uso en el tratamiento o prevención del(los) cáncer(es).

(5) El agente inmunoinductor para su uso de acuerdo con (4), en el que dicho(s) cáncer(es) es/son cáncer(es) que expresan KATNAL1.

(6) El agente inmunoinductor para su uso de acuerdo con (4) o (5), en el que dicho(s) cáncer(es) es/son cáncer de mama, tumor cerebral, adenocarcinoma perianal, neuroblastoma, mastocitoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides y/o leucemia.

(7) El agente inmunoinductor para su uso de acuerdo con uno cualquiera de (1)-(6), que comprende además un inmunopotenciador.

(8) El agente inmunoinductor para su uso de acuerdo con (7), en el que dicho inmunopotenciador es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en adyuvante incompleto de Freund; montanida; poli-I:C y derivados del mismo; oligonucleótidos de CpG, interleucina 12; interleucina 12; interferón α , interferón β ; interferón ω ; interferón γ y ligando Flt3.

(9) Un método *in vitro* de preparar una célula presentadora de antígeno, comprendiendo el método poner en contacto la célula presentadora de antígeno con dicho al menos un polipéptido seleccionado de entre: (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 2, 8, 10 y 12; y (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de no menos del 85 % con un polipéptido (a).

(10) Un método *in vitro* de preparar un linfocito T citotóxico, comprendiendo el método cocultivar una célula presentadora de antígeno preparada de acuerdo con el método de (9) con al menos un linfocito T y permitir que prolifere el al menos un linfocito T.

(11) Un método *in vitro* de acuerdo con (10), en el que se usa opcionalmente una proporción de célula presentadora de antígeno: linfocito T de 1:1 a 1:100 en el que los ejemplos de cultivo mencionados posteriormente, la administración del polipéptido usado en la presente invención a un organismo vivo permite la inducción de inmunocitos en el organismo vivo y puede reducirse o hacerse regresar un cáncer que ya ha aparecido. Por lo

tanto, el polipéptido es útil para terapia y/o profilaxis del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La fig. 1 muestra los patrones de expresión del gen KATNAL1 identificado en tejidos normales, tejidos tumorales y líneas celulares de cáncer de perro. Referencia numérica 1, los patrones de expresión del gen KATNAL1 de perro en diversos tejidos y líneas celulares de perro; Referencia numérica 2, los patrones de expresión del gen GAPDH de perro en diversos tejidos y líneas celulares de perro;
- 10 La fig. 2 muestra los patrones de expresión del gen KATNAL1 identificado en tejidos normales, tejidos tumorales y líneas celulares de cáncer humano. Referencia numérica 3, los patrones de expresión del gen KATNAL1 humano en diversos tejidos y líneas celulares humanas; Referencia numérica 4, los patrones de expresión del gen GAPDH humano en diversos tejidos y líneas celulares humanas.
- 15 La fig. 3 muestra los patrones de expresión del gen KATNAL1 identificado en tejidos normales, tejidos tumorales y líneas celulares de cáncer de ratón. Referencia numérica 5, los patrones de expresión del gen KATNAL1 de ratón en diversos tejidos y líneas celulares de ratón; Referencia numérica 6, los patrones de expresión del gen GAPDH de ratón en diversos tejidos y líneas celulares de ratón.

Modo óptimo de llevar a cabo la invención

- 20 Los ejemplos del polipéptido contenido en el agente inmunoadyuvante de la presente invención como principio eficaz incluyen los siguientes. El término "polipéptido" significa una molécula formada por una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos e incluye no solo moléculas de polipéptido que tienen grandes números de aminoácidos que las constituyen, sino también moléculas de bajo peso molecular que tienen números pequeños de aminoácidos (oligopéptidos) y proteínas de longitud completa. La presente invención usa las proteínas KATNAL1 de longitud completa que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 8, 10 o 12.

- (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:4, 2, 8, 10 o 12 del LISTADO DE SECUENCIAS y tiene actividad inmunoadyuvante.
- 30 (b) un polipéptido, polipéptido que tiene una identidad de secuencia de no menos del 85 % con el polipéptido (a) y una actividad inmunoadyuvante.

- En la presente invención, la expresión "que tiene una secuencia de aminoácidos" significa que los restos de aminoácidos están dispuestos en dicho orden. Por lo tanto, por ejemplo, "polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2" significa polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de Met Asn Leu Ala ... (corte)... Glu Phe Gly Ser Ala que se muestra en la SEQ ID NO:2, polipéptido que tiene un tamaño de 490 restos de aminoácidos. Además, por ejemplo, "polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2" puede denominarse como "polipéptido de SEQ ID NO:2" para abreviar. Esto también es pertinente para la expresión "que tiene una secuencia de bases". En este caso, el término "que tiene" puede sustituirse por la expresión "compuesto de"

- 40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "actividad inmunoadyuvante" significa una capacidad de inducir inmunocitos que segregan citocinas tales como interferón en un organismo vivo.

- Puede confirmarse si el polipéptido tiene o no una actividad inmunoadyuvante usando, por ejemplo, el conocido ensayo ELISPOT. Más específicamente, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos a continuación, se obtienen células tales como células mononucleares de sangre periférica a partir de un organismo vivo sometido a administración del polipéptido cuya actividad inmunoadyuvante se va a evaluar y las células obtenidas se cocultivan después con el polipéptido, seguido de medición de la (s) cantidad(es) de una(s) citocina(s) producidas por las células usando un(os) anticuerpo(s) específico(s), posibilitando de esa forma la medición del número de inmunocitos entre las células. Mediante esto, es posible la evaluación de la actividad inmunoadyuvante.

- 50 Como alternativa, tal como se describe en los ejemplos que se mencionan posteriormente, la administración del polipéptido recombinante de cualquiera de (a) o (b) descrito anteriormente a un animal portador de un tumor permite la regresión del tumor mediante su actividad inmunoadyuvante. Por lo tanto, la actividad inmunoadyuvante anterior puede evaluarse también como una capacidad de suprimir el crecimiento de células cancerosas o de causar la reducción o desaparición de un tejido canceroso (tumor) (de aquí en adelante denominada como "actividad antitumoral"). La actividad antitumoral de un polipéptido puede confirmarse mediante, por ejemplo, tal como se describe de forma más específica en los ejemplos a de más adelante, la observación de si un tumor se reduce o no cuando el polipéptido se administró realmente a un organismo vivo portador de un tumor.

- 60 Como alternativa, la actividad antitumoral de un polipéptido puede evaluarse también mediante la observación de si los linfocitos T estimulados con el polipéptido (esto es, linfocitos T puestos en contacto con células presentadoras de antígeno que presentan el polipéptido) muestran o no una actividad citotóxica contra las células tumorales *in vitro*. El contacto entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno puede llevarse a cabo mediante su cocultivo en un medio líquido, tal como se menciona más adelante. La medición de la actividad citotóxica puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el conocido método llamado ensayo de liberación de ⁵¹Cr descrito en Int. J. Cancer, 58: pág. 317, 1994. En los casos en los que el polipéptido va a usarse para terapia y/o profilaxis del cáncer, la evaluación de la

capacidad inmunoaductora se lleva a cabo preferentemente usando la actividad antitumoral como índice, aunque el índice no se limita a ésta.

Cada una de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NO: 4, 8, 10 y 12 del LISTADO DE SECUENCIAS desvelado en la presente invención es una secuencia de aminoácidos de la proteína KATNAL1 que se ha aislado, mediante el método SEREX, usando una biblioteca de ADNc procedente de testículo de perro y suero obtenido de un perro portador de un tumor, como un polipéptido que se une de forma específica a un anticuerpo existente en el suero de un perro portador de un tumor, o un factor homólogo del polipéptido en el ser humano, vaca, caballo o pollo (véase el ejemplo 1). La KATNAL1 humana, que es el factor homólogo humano de KATNAL1 de perro, tiene una identidad de secuencia del 95 % en cuanto a la secuencia de bases y del 98 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos; la KATNAL1 bovina, que es el factor homólogo bovino, tiene una identidad de secuencia del 91 % en cuanto a la secuencia de bases y del 97 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos; la KATNAL1 equina, que es el factor homólogo equino, tiene una identidad de secuencia del 87 % en cuanto a la secuencia de bases y del 88 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos; y la KATNAL1 de pollo, que es el factor homólogo de pollo, tiene una identidad de secuencia del 81 % en cuanto a la secuencia de bases y del 90 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos.

El polipéptido (a) es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 8, 10 o 12 y tiene actividad inmunoaductora. El polipéptido es más preferentemente un polipéptido compuesto de una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de no menos del 85 % con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4 y el polipéptido especialmente preferible tiene la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 2, 4, 8, 10 o 12. Tal como se conoce en la técnica, un polipéptido que tiene no menos de alrededor de 7 restos de aminoácidos puede ejercer su antigenicidad e inmunogenicidad. Por lo tanto, un polipéptido que tiene no menos de alrededor de 7 restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2 o 4 puede tener una actividad inmunoaductora, de modo que el polipéptido puede usarse para la preparación del agente inmunoaductor.

Como principio de inducción inmunitaria mediante administración de un polipéptido antigénico frente al cáncer, se conoce el siguiente procedimiento: se incorpora un polipéptido dentro de una célula presentadora de antígeno y después se degrada en fragmentos más pequeños mediante peptidasas de la célula, seguido de la presentación sobre la superficie de la célula. Los fragmentos son reconocidos por un linfocito T citotóxico o similar que destruye de forma selectiva a las células presentadoras de antígeno. El tamaño de los polipéptidos que se presentan sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno es relativamente pequeño y de alrededor de 7 a 30 aminoácidos. Por lo tanto, desde el punto de vista de la presentación del polipéptido sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno, un modo preferido del polipéptido (a) descrito anteriormente es un polipéptido compuesto de alrededor de 7 a 30 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO:2, 4, 8, 10 o 12 y, más preferentemente, polipéptido compuesto de alrededor de 8 a 30 aminoácidos o de alrededor de 9 a 30 aminoácidos es suficiente como polipéptido (a). En algunos casos, estos polipéptidos relativamente pequeños se presentan directamente sobre las células presentadoras de antígeno sin incorporarse dentro de las células presentadoras de antígeno.

Además, un polipéptido incorporado dentro de una célula presentadora de antígeno se escinde en sitios aleatorios mediante peptidasas de la célula para dar diversos fragmentos de polipéptido, los cuales se presentan después sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno. Por lo tanto, la administración de un polipéptido grande tal como la región de longitud completa de las SEQ ID NO:2, 4, 8, 10 o 12 causa inevitablemente producción de fragmentos de polipéptido por la degradación en la célula presentadora de antígeno, fragmentos que son eficaces para la inmunoaducción por medio de la célula presentadora de antígeno. Por lo tanto, también para la inmunoaducción por medio de células presentadoras de antígeno, puede usarse preferentemente un polipéptido grande y el polipéptido puede estar compuesto de no menos de 30, preferentemente no menos de 100, preferentemente no menos de 200, aún más preferentemente no menos de 250 aminoácidos. El polipéptido puede estar compuesto aún más preferentemente de la región de longitud completa de las SEQ ID NO:2, 4, 8, 10 o 12.

El polipéptido (b) es el mismo polipéptido que el polipéptido (a), excepto porque un número pequeño de restos de aminoácidos (preferentemente uno o varios) se sustituyen, eliminan o insertan, el cual tiene una identidad de secuencia de no menos del 90 %, preferentemente no menos del 95 %, más preferentemente no menos del 98 %, aún más preferentemente no menos del 99 % o no menos del 99,5 % con la secuencia original y tiene una actividad inmunoaductora. Se conoce bien en la técnica que, en general, hay casos en los que un antígeno proteico conserva casi la misma antigenicidad que la proteína original aun cuando la secuencia de aminoácidos de la proteína se modifique de modo que un número pequeño de restos de aminoácidos se sustituyan, eliminen o inserten. Por lo tanto, como el polipéptido (b) también puede ejercer una actividad inmunoaductora, puede usarse para la preparación del agente inmunoaductor para su uso de acuerdo con la presente invención. Además, el polipéptido (b) también es preferentemente un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 8, 10 o 12, excepto porque uno o varios restos de aminoácidos se sustituyen, eliminan y/o insertan. Tal como se usa en el presente documento, el término "varios" significa 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 secuencias de aminoácidos o secuencias de bases significa el valor calculado alineando dos secuencias de aminoácidos (o secuencias de bases) para comparar, de modo que el número de restos de aminoácidos (o bases) emparejados entre las secuencias de

aminoácidos (o secuencias de bases) sea máximo, y dividiendo el número de restos de aminoácidos emparejados (o el número de bases emparejadas) por el número total de restos de aminoácidos (o el número total de bases), cuyo valor se representa como un porcentaje. Cuando se lleva a cabo el alineamiento, se insertan uno o más huecos dentro de una o las dos secuencias para comparar según sea necesario. Dicho alineamiento de secuencias puede llevarse a cabo usando 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 calculado contando un hueco como un resto de aminoácido. Cuando el número total de restos de aminoácidos así contados es diferente entre las dos secuencias para comparar, la identidad de secuencia (%) se calcula dividiendo el número de restos de aminoácidos emparejados por el número total de restos de aminoácidos de la secuencia más larga.

Los 20 tipos de aminoácidos que constituyen proteínas de origen natural pueden clasificarse en grupos, en cada uno de los cuales se comparten propiedades similares, por ejemplo, en aminoácidos neutros con cadenas laterales que tienen baja polaridad (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 lo tanto, en los casos en los que se sustituye un resto de aminoácido en el polipéptido (a) de la presente invención, la probabilidad de que pueda conservarse la actividad inmunoadyuvante puede aumentarse llevando a cabo la sustitución dentro del mismo grupo, lo cual se prefiere.

El polipéptido (c) es un polipéptido que comprende el polipéptido (a) o (b) como una secuencia parcial y tiene una actividad inmunoadyuvante. Esto es, el polipéptido (c) es un polipéptido en el cual se añaden uno o más aminoácidos o uno o más polipéptidos a uno o ambos extremos del polipéptido (a) o (b) y tiene una actividad inmunoadyuvante. Dicho polipéptido también puede usarse para la preparación del agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención.

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

El polinucleótido que codifica el polipéptido anterior puede prepararse fácilmente mediante una técnica de ingeniería genética conocida o un método convencional usando un sintetizador de ácido nucleico disponible comercialmente. Por ejemplo, el ADN que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO:1 puede prepararse llevando a cabo una PCR usando un ADN cromosómico o una biblioteca de ADNc de perro como molde y un par de cebadores diseñados de modo que la secuencia de bases de SEQ ID NO:1 pueda amplificarse con ellos. El ADN que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO:3 puede prepararse de forma similar usando un ADN cromosómico o una biblioteca de ADNc humano como molde. Las condiciones de reacción para la PCR pueden ajustarse apropiadamente y los ejemplos de las condiciones de reacción incluyen, pero no se limitan a, repetir el proceso de reacción de 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante 30 segundos a 1 minuto (hibridación) y 72 °C durante 2 minutos (elongación) durante, por ejemplo, 30 ciclos, seguidos de reacción a 72 °C durante 7 minutos. Además, el ADN deseado puede aislarse preparando una sonda o cebador apropiados basándose en la información de la secuencia de bases o la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:1 o 3 del LISTADO DE SECUENCIAS de la presente descripción y explorando una biblioteca de ADNc de perro, humana o similar usando la sonda o cebador. La biblioteca de ADNc se prepara preferentemente a partir de células, un órgano o un tejido que expresan la proteína de las SEQ ID NO:2 o 4. Las operaciones descritas anteriormente tales como preparación de la sonda o cebador, construcción de la biblioteca de ADNc, exploración de la biblioteca de ADNc y clonación del gen de interés son conocidas por los expertos en la técnica y pueden llevarse 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 así obtenido, puede obtenerse ADN que codifica el polipéptido (a). Además, como se conocen los codones que codifican cada aminoácido, la secuencia de bases de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos específica puede especificarse fácilmente. Por lo tanto, como la secuencia de bases de un polinucleótido que codifica el polipéptido (b) o el polipéptido (c) también puede especificarse fácilmente, dicho polinucleótido también puede sintetizarse fácilmente usando un sintetizador de ácido nucleico disponible comercialmente de acuerdo con un método convencional.

Las células anfitrionas no se restringen, siempre y cuando las células puedan expresar el polipéptido descrito anteriormente y los ejemplos de células incluyen, pero no se limitan a, células procariotas, tales como *Escherichia coli*; y células eucariotas tales como células cultivadas de mamífero incluyendo células de riñón de mono COS1 y células de ovario de hámster chino CHO; levadura en gemación; levadura en fisión; células de gusano de seda y células de huevos de *Xenopus laevis*.

En los casos en los que se usan células procariotas como células anfitrionas, se usa un vector de expresión que contiene un origen que posibilita la replicación del vector en una célula procariota, un promotor, un sitio de unión a ribosomas, un sitio de clonación de ADN, un terminador y/o similar. Los ejemplos del vector de expresión para *E. coli*

incluyen el sistema pUC, pBluescriptII, sistema de expresión pET y sistema de expresión pGEX. Incorporando un ADN que codifica el polipéptido anterior dentro de dicho vector de expresión y transformando células anfitrionas procarionas con el vector, seguido de cultivo de los transformantes resultantes, el polipéptido codificado por el ADN puede expresarse en las células anfitrionas procarionas. En tal caso, el polipéptido también puede expresarse como una proteína de fusión con otra proteína.

En los casos en los que se usan células eucariotas como células anfitrionas, se usa un vector de expresión para células eucariotas, que comprende un promotor, sitio de corte y empalme, sitio de adición de poli (A) y/o similar como el vector de expresión. Los ejemplos de dicho vector de expresión incluyen pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, vector de VEB pRS, pcDNA3, pMSG y pYES2. De forma similar al caso anterior, incorporando un ADN que codifica el polipéptido anterior dentro de dicho vector de expresión y transformando células anfitrionas eucariotas con el vector, seguido de cultivo de los transformantes resultantes, el polipéptido codificado por el ADN puede expresarse en las células anfitrionas eucariotas. En los casos en los que se usa pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1, pEGFP-C1 o similar como el vector de expresión, el polipéptido anterior puede expresarse como una proteína de fusión que comprende un marcador tal como un marcador de His, un marcador FLAG, un marcador myc, un marcador HA o GFP

Para la introducción del vector de expresión dentro de las células anfitrionas, puede usarse un método bien conocido tal como electroporación, el método del fosfato cálcico, el método de los liposomas o el método de DEAE-dextrano.

El aislamiento y purificación del polipéptido de interés a partir de las células anfitrionas puede llevarse a cabo mediante una combinación de operaciones de separación conocidas. Los ejemplos de las operaciones de separación conocidas incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con un desnaturalizante tal como urea o con un tensioactivo; tratamiento con ultrasonido; digestión enzimática; expulsión salina o precipitación fraccionada del 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, tal como se ha mencionado anteriormente, aquellos en forma de una proteína de fusión con otra proteína arbitraria. Los ejemplos de dichos polipéptidos incluyen proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST) y proteínas de fusión con un marcador de His. Dicho polipéptido en forma de una proteína de fusión también se incluye dentro del alcance de la presente invención como el polipéptido (c) descrito anteriormente. Además, en algunos casos, el polipéptido expresado en una célula transformada se modifica de diversas formas en la célula después de la traducción. Dicho polipéptido modificado postraduccionalmente también se incluye dentro del alcance de la presente invención siempre y cuando tenga una actividad inmunoadyuvante. Los ejemplos de dicha modificación postraduccionales incluyen: eliminación de metionina N-terminal; acetilación N-terminal; glucosilación; degradación limitada por una proteasa intracelular; miristoilación; isoprenilación y fosforilación.

Tal como se describe de forma más concreta en los ejemplos que se mencionan más adelante, la administración del polipéptido que tiene una actividad inmunoadyuvante a un organismo vivo portador de un tumor posibilita la regresión de un tumor ya existente. Por lo tanto, el agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención puede usarse como agente terapéutico y/o profiláctico para el cáncer. Además, el polipéptido que tiene una actividad inmunoadyuvante puede usarse para un método de terapia y/o profilaxis del cáncer mediante inmunización.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tumor" y "cáncer" significan una neoplasia maligna y se usan indistintamente.

En este caso, el cáncer que se va a tratar no se restringe, siempre y cuando el gen que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:KATNAL1 se exprese en el cáncer y el cáncer sea preferentemente cáncer de mama, tumor cerebral, adenocarcinoma perianal, neuroblastoma, mastocitoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides o leucemia.

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

La vía de administración del agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención a un organismo vivo puede ser, bien administración oral, o bien administración parenteral y es preferentemente administración parenteral tal como administración intramuscular, administración subcutánea, administración intravenosa o administración intraarterial. En los casos en los que el agente inmunoadyuvante se usa para terapia del cáncer, puede administrarse a un ganglio linfático regional cerca del tumor que se va a tratar, tal como se describe en los ejemplos a continuación, a fin de potenciar su actividad anticancerosa. La dosis puede ser cualquier dosis siempre y cuando la dosis sea eficaz para la inmunización y, por ejemplo, en los casos en los que el agente se usa para terapia y/o profilaxis del cáncer, la dosis puede ser una eficaz para terapia y/o profilaxis del cáncer. La dosis eficaz para terapia y/o profilaxis del cáncer se selecciona apropiadamente dependiendo del tamaño, síntomas y similares del tumor y la dosis eficaz es habitualmente de 0,0001 µg a 1000 µg, preferentemente de 0,001 µg a 1000 µg por animal objeto por día. El

agente puede administrarse una vez, o de forma dividida en varias veces. El agente se administra preferentemente de forma dividida en varias veces, cada varios días a varios meses. Tal como se muestra concretamente en los ejemplos más adelante, el agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención puede causar regresión de un tumor que ya ha aparecido. Por lo tanto, como el agente también puede ejercer su actividad anticancerosa contra un número pequeño de células cancerosas en un estadio precoz, el desarrollo o recidiva del cáncer pueden prevenirse usando el agente antes del desarrollo del cáncer o después de la terapia para el cáncer. Esto es, el agente inmunoadyuvante de la presente invención es eficaz tanto para la terapia como para la profilaxis del cáncer.

El agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención puede contener solamente un polipéptido o puede formularse mezclándose de la forma apropiada 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 se conocen bien en el campo de la formulación de los productos farmacéuticos y puede usarse cualquiera de los métodos o aditivos. Los ejemplos específicos de los aditivos incluyen, pero no se limitan a, diluyentes tales como soluciones de tampón fisiológicas; vehículos tales como azúcar, lactosa, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol y glicina; aglutinantes tales como jarabe, gelatina, goma arábiga, sorbitol, cloruro de polivinilo y tragacanto; y lubricantes tales como estearato de magnesio, polietilenglicol, talco y sílice. Los ejemplos de la formulación incluyen preparaciones orales tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, jarabes; y otras formulaciones tales como inhalantes, soluciones para inyección, supositorios y soluciones. Estas formulaciones pueden prepararse mediante métodos de producción conocidos comúnmente.

El agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención puede usarse en combinación con un inmunopotenciador capaz de potenciar la respuesta inmunitaria en un organismo vivo. El inmunopotenciador puede estar contenido en el agente inmunoadyuvante de la presente invención o administrarse como una composición separada a un paciente en combinación con el agente inmunoadyuvante de la presente invención.

Los ejemplos del inmunopotenciador incluyen adyuvantes. Los adyuvantes pueden potenciar la respuesta inmunitaria proporcionando un reservorio de antígeno (extracelularmente o dentro de los macrófagos), activando macrófagos y estimulando grupos específicos de linfocitos, potenciando de esa forma la respuesta inmunitaria y, por tanto, la acción anticancerosa. Por lo tanto, especialmente en los casos en los que el agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención se usa para terapia y/o profilaxis del cáncer, el agente inmunoadyuvante comprende preferentemente un adyuvante, además del polipéptido descrito anteriormente, como principio eficaz. Se conocen bien en la técnica numerosos tipos de adyuvantes y puede usarse cualquiera de estos adyuvantes. Los ejemplos específicos de los adyuvantes incluyen MPL (SmithKline Beecham), homólogos de lipopolisacárido Re 595 de *Salmonella minnesota* obtenidos después de la 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, págs. 178-186); adyuvante incompleto de Freund; adyuvante completo de Freund; vitamina E montanida; alumbre; oligonucleótidos de CpG (véase, por ejemplo, Kreig y 7 colaboradores, Nature, vol. 374, págs. 546-549); poli-I:C y derivados del mismo (p. ej., poly ICLC) y diversas emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites biodegradables, tales como escualeno y/o tocoferol. Entre estos, se prefieren el adyuvante incompleto de Freund; montanida; poli-I:C y derivados del mismo; oligonucleótidos de CpG. La proporción de mezcla entre el adyuvante descrito anteriormente y el polipéptido es normalmente de alrededor de 1:10 a 10:1, preferentemente de alrededor de 1:5 a 5:1, más preferentemente de alrededor de 1:1. Sin embargo, el adyuvante no se limita a los ejemplos descritos anteriormente y los adyuvantes conocidos en la técnica distintos de los descritos anteriormente también pueden usarse cuando se administra el agente inmunoadyuvante de la presente invención (véase, por ejemplo, Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª edición", 1986). Los métodos de preparación de mezclas o emulsiones para un polipéptido y un adyuvante son bien conocidos para los expertos en la técnica de la vacunación.

Además, adicionalmente a los adyuvantes descritos anteriormente, pueden usarse factores que estimulan la respuesta inmunitaria del sujeto como el inmunopotenciador descrito anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse diversas citocinas que tienen una propiedad de estimular linfocitos y/o células presentadoras de antígeno como el inmunopotenciador en combinación con el agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención. Son conocidas para los expertos en la técnica una serie de dichas citocinas capaces de potenciar la respuesta inmunitaria y los ejemplos de citocinas incluyen, pero no se limitan a, interleucina 12 (IL-12), GM-CSF, IL-18, interferón α , interferón β , interferón ω , interferón γ , y ligando Flt3, las cuales se ha demostrado que potencian la acción profiláctica de las vacunas. Dichos factores también pueden usarse como el inmunopotenciador descrito anteriormente y pueden estar contenidos en el agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención, o pueden prepararse como una composición separada para administrarse al paciente en combinación con el agente inmunoadyuvante para su uso de acuerdo con la presente invención.

Poniendo el polipéptido descrito anteriormente en contacto con células presentadoras de antígeno *in vitro*, puede hacerse que las células presentadoras de antígeno presenten el polipéptido. Esto es, los polipéptidos (a) a (c) descritos anteriormente pueden usarse como agentes para tratar las células presentadoras de antígeno. Los ejemplos de las células presentadoras de antígeno que pueden usarse preferentemente incluyen células dendríticas y linfocitos B que tienen moléculas de MHC de clase I. Se han identificado diversas moléculas de MHC de clase I y son bien conocidas. Las moléculas de MHC del ser humano se llaman HLA. Los ejemplos de moléculas HLA de clase I incluyen

HLA-A, HLA-B y HLA-C, de forma más específica, 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 linfocitos B que tienen moléculas de MHC de clase I pueden prepararse a partir de sangre periférica mediante un método bien conocido. Por ejemplo, pueden inducirse células dendríticas específicas de tumor induciendo células dendríticas de médula ósea, cordón umbilical o sangre periférica del paciente usando factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) e IL-3 (o IL-4) y añadiendo después un péptido relacionado con tumor al sistema de cultivo.

Administrando una cantidad eficaz de dichas células dendríticas, puede inducirse una respuesta deseada para la terapia de un cáncer. Como células, pueden usarse médula ósea o cordón umbilical donados por un individuo sano, o médula ósea, sangre periférica o similar del paciente. Cuando se usan células autólogas del paciente, puede conseguirse una alta seguridad y se espera evitar efectos secundarios graves. La sangre periférica o la médula ósea pueden ser cualquiera de muestra fresca, muestra refrigerada y muestra criopreservada. Al igual que para la sangre periférica, puede cultivarse la sangre total o pueden separarse y cultivarse los componentes leucocitarios, y lo último se es más eficaz y, por tanto, se prefiere. Además, entre los componentes leucocitarios, pueden separarse las células mononucleares. En los casos en los que las células se originan a partir de médula ósea o sangre de cordón umbilical, pueden cultivarse todas las células que constituyen la médula ósea, o pueden separarse de ellas y cultivarse las células mononucleares. La sangre periférica, los componentes leucocitarios de la misma y las células de la médula ósea contienen células mononucleares, citoblastos hematopoyéticos y células dendríticas inmaduras, a partir de las cuales se originan células dendríticas y también células CD4 positivas y similares. El método de producción para la citocina no se restringe y puede emplearse una citocina de origen natural o recombinante o similar, siempre y cuando se hayan confirmado su seguridad y actividad fisiológica. Preferentemente, se usa una preparación con calidad garantizada para uso médico en la cantidad mínima necesaria. La concentración de la(s) citocina(s) que se ha de añadir no se restringe, siempre y cuando se induzcan las células dendríticas a la concentración y, habitualmente, la concentración total de la(s) citocina(s) es preferentemente de alrededor de 10 a 1000 ng/ml, más preferentemente de alrededor de 20 a 500 ng/ml. El cultivo puede llevarse a cabo usando un medio bien conocido usado habitualmente para cultivo de leucocitos. La temperatura de cultivo no se restringe, siempre y cuando la proliferación de leucocitos sea posible a la temperatura, y la más preferida es una temperatura de alrededor de 37 °C, que es la temperatura corporal del ser humano. El entorno atmosférico durante el cultivo no se restringe, siempre y cuando la proliferación de los leucocitos sea posible en el entorno, y el cultivo se lleva a cabo preferentemente en un flujo de CO₂ al 5 %. El periodo de cultivo no se restringe, siempre y cuando se induzcan un número necesario de las células, y habitualmente es de 3 días a 2 semanas. Al igual que para los aparatos usados para la separación y cultivo de las células, pueden emplearse aparatos apropiados, preferentemente aquellos cuya seguridad para la aplicación en usos médicos se ha confirmado y cuyas operaciones son estables y simples. En particular, los ejemplos de aparato de cultivo celular incluyen no solo recipientes generales como placas de Petri, recipientes y frascos, sino también recipientes de tipo capa, recipientes multifásicos, frascos rotatorios, frascos de agitación, recipientes de cultivo de tipo bolsa y columnas de fibra hueca.

El propio método que va a usarse para poner el polipéptido descrito anteriormente en contacto con las células presentadoras de antígeno *in vitro* pueden ser de los bien conocidos 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 se restringe, y es habitualmente de alrededor de 1 a 100 µg/ml, preferentemente de alrededor de 5 a 20 µg/ml. La densidad celular durante el cultivo no se restringe y es habitualmente de alrededor de 10³ a 10⁷ células/ml, referentemente de alrededor de 5x10⁴ a 5x10⁶ células/ml. El cultivo se lleva a cabo preferentemente de acuerdo con un método convencional a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %. La longitud máxima del péptido que puede presentarse sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos es habitualmente de alrededor de 30 restos de aminoácidos. Por lo tanto, en los casos en los que las células presentadoras de antígeno se ponen en contacto con el polipéptido *in vitro*, el polipéptido puede prepararse de modo que su longitud no sea de más de 30 restos de aminoácidos, aunque la longitud no se restringe.

Cultivando las células presentadoras de antígeno en coexistencia con el polipéptido descrito anteriormente, el polipéptido se incorpora dentro de las moléculas de MHC de las células presentadoras de antígeno y se presenta sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, usando el polipéptido descrito anteriormente, pueden prepararse células presentadoras de antígeno aisladas que contienen el complejo entre el polipéptido y la molécula de MHC. Dichas células presentadoras de antígenos pueden presentar el polipéptido contra los linfocitos T *in vivo* o *in vitro*, para inducir y permitir la proliferación de linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido.

Poniendo en contacto las células presentadoras de antígeno así preparadas que tienen el complejo entre el polipéptido descrito anteriormente y la molécula de MHC con los linfocitos T *in vitro*, pueden inducirse linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido y permitir que proliferen. Esto puede llevarse a cabo cocultivando las células presentadoras de antígeno descritas anteriormente y linfocitos T en un medio líquido. Por ejemplo, las células presentadoras de antígeno pueden suspenderse en un medio líquido y colocarse en un recipiente tal como un pocillo de una microplaca, seguido de la adición de linfocitos T al pocillo y después realizar el cultivo. La proporción de mezcla de las células presentadoras de antígeno con respecto a los linfocitos T en el cocultivo no se restringe y es

habitualmente de alrededor de 1:1 a 1:100, preferentemente de alrededor de 1:5 a 1:20 en cuanto al número de células. La densidad de las células presentadoras de antígeno que se van a suspender en el medio líquido no se restringe y es habitualmente de alrededor de 100 a 10.000.000 células/ml, preferentemente de alrededor de 10.000 a 1.000.000 células/ml. El cultivo se lleva a cabo mediante un método convencional a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %.

5 El periodo de cultivo no se restringe y habitualmente es de 2 días a 3 semanas, y habitualmente es de 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 dichos casos, la concentración de IL-2 o IL-7 es habitualmente de alrededor de 5 a 20 U/ml, la concentración de IL-6 es habitualmente de alrededor de 500 a 2000 U/ml y la concentración de IL-12 es habitualmente de alrededor de 5 a 20 U/ml, pero las concentraciones de las interleucinas no se restringen a éstas. El cocultivo
10 anterior puede repetirse de una a varias veces con adición de células presentadoras de antígenos frescas. Por ejemplo, La operación de eliminar el sobrenadante de cultivo después del cocultivo y añadir una suspensión fresca de células presentadoras de antígeno para seguir llevando a cabo el cocultivo puede repetirse de una a varias veces. Las condiciones para cada cocultivo pueden ser las mismas que las descritas anteriormente.

15 Mediante el cocultivo descrito anteriormente, se inducen linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido y se permite que proliferen. Por lo tanto, usando el polipéptido descrito anteriormente, pueden prepararse linfocitos T aislados que se unen de forma selectiva al complejo entre el polipéptido y la molécula de MHC.

Tal como se describe en los ejemplos de más adelante, el gen KATNAL1 se expresa de forma específica en células de
20 cáncer de mama, tejidos de cáncer de mama, células de tumor cerebral, tejidos de tumor cerebral, tejidos de adenocarcinoma perianal, células de adenocarcinoma perianal, tejidos de mastocitoma, células de mastocitoma, células de neuroblastoma, células de cáncer de hígado, tejidos de cáncer de hígado, células de cáncer de próstata, tejidos de cáncer de próstata, células de cáncer de pulmón, tejidos de cáncer de pulmón, células de cáncer de tiroides, tejidos de cáncer de tiroides, y células de leucemia. Por lo tanto, se piensa que, en estas especies de cáncer, existe
25 una cantidad de KATNAL1 significativamente mayor que en las células normales. Por lo tanto, cuando las moléculas de MHC presentan una parte del polipéptido KATNAL1 presente en células sobre la superficie de las células cancerosas y los linfocitos T citotóxicos así preparados se administran al organismo vivo, los linfocitos T citotóxicos pueden dañar a las células cancerosas usando el polipéptido presentado como marcador. Como las células presentadoras de antígeno que presentan el polipéptido descrito anteriormente pueden inducir y permitir la
30 proliferación de linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido también *in vivo*, las células cancerosas pueden dañarse también administrando las células presentadoras de antígeno a un organismo vivo. Esto es, los linfocitos T citotóxicos y las células presentadoras de antígeno preparadas usando el polipéptido también son eficaces como agentes terapéuticos y/o profilácticos para el cáncer, de forma similar al agente inmunoadyuvante de la presente invención.

35 En los casos en los que las células presentadoras de antígeno aisladas o los linfocitos T aislados descritos anteriormente se administran a un organismo vivo, estos se preparan preferentemente tratando las células presentadoras de antígeno o los linfocitos T recogidos del paciente que se va a tratar, usando el polipéptido (a) o (b) descrito anteriormente con el fin de evitar la respuesta inmunitaria en el organismo vivo que ataque a estas células como cuerpos extraños.
40

El agente terapéutico y/o profiláctico para el cáncer que comprende como principio eficaz las células presentadoras de antígeno o los linfocitos T se administra preferentemente por medio de una vía de administración parenteral, por
45 ejemplo, mediante administración intravenosa o intraarterial. La dosis se selecciona apropiadamente dependiendo de los síntomas, el propósito de la administración y similar y es habitualmente de alrededor de 1 célula a 10.000.000.000.000 células, preferentemente de 1.000.000 células a 1.000.000.000 células, dosis que 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 tampón salino fisiológico y la formulación puede usarse en combinación con otra(s) preparación/preparaciones y/o citocina(s) anticancerosa(s). Además, también pueden añadirse uno o más aditivos
50 bien conocidos en el campo de la formulación de productos farmacéuticos.

Expresando un polinucleótido que codifica cualquiera de los polipéptidos (a) a (b) en el organismo del animal objeto también puede inducirse la producción de anticuerpos y linfocitos T citotóxicos en el organismo vivo y puede obtenerse un efecto comparable al obtenido en el caso de la administración del polipéptido. Esto es, el agente inmunoadyuvante
55 para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser uno que comprende como principio eficaz un vector recombinante que tiene un polinucleótido que codifica cualquiera de los polinucleótidos (a) a (b), vector recombinante que es capaz de expresar el polipéptido en un organismo vivo. Dicho vector recombinante capaz de expresar un polipéptido antigénico tal como se muestra en los ejemplos que se mencionan posteriormente también se llama vacuna génica.

60 El vector usado para la producción de la vacuna génica no se restringe siempre y cuando sea un vector capaz de expresar el polipéptido en una célula del animal objeto (preferentemente en una célula de mamífero) y puede ser, bien un vector de plásmido o bien un vector de virus y puede usarse cualquier vector conocido en el campo de las vacunas génicas. El polinucleótido tal como un ADN o ARN que codifica el polipéptido descrito anteriormente puede prepararse
65 fácilmente tal como se ha mencionado anteriormente mediante un método convencional. La incorporación del polinucleótido dentro del vector puede llevarse a cabo usando un método bien conocido para los expertos en la

técnica.

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

Los ejemplos del método que usa un vector de virus incluyen aquellos en los que se incorpora un polinucleótido que codifica el polipéptido descrito anteriormente dentro de un virus de ARN o un virus de ADN, tal como un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, virus variolovacunal, poxvirus, poliovirus o virus Sinbis y después se infecta un animal objeto con el virus resultante. Entre estos métodos, se prefieren especialmente los que usan un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus variolovacunal o similar.

Los ejemplos de otros métodos incluyen un método en el que se administra directamente un plásmido de expresión por vía intramuscular (método de vacuna de ADN) y el método del liposoma, método de lipofectina, método de microinyección, método del fosfato cálcico y método de electroporación. Se prefieren especialmente el método de la vacuna de ADN y el método del liposoma.

Los métodos para fabricar el gen que codifica el polipéptido descrito anteriormente usado en la presente invención actúan realmente como un producto farmacéutico, incluyen métodos *in vivo* en los que el gen se introduce directamente dentro del organismo y métodos *ex vivo* en los que se recogen del animal objeto un tipo determinado de células y el gen se introduce después en las células *ex vivo*, seguido de la devolución de las células al organismo (Nikkei Science, 1994, abril, págs. 20-45; The Pharmaceutical Monthly, 1994, vol. 36, n.º 1, págs. 23-48; Experimental Medicine, edición extraordinaria, 1994, vol.12, n.º 15; y las referencias citadas en estas bibliografías, y similares). Se prefieren más los métodos *in vivo*.

En los casos en los que el gen se administra mediante un método *in vivo*, el gen puede administrarse mediante una vía de administración apropiada dependiendo de la enfermedad que se va a tratar, síntomas y similares. El gen puede administrarse, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular. En los casos en los que el gen se administra mediante un método *in vitro*, el gen puede formularse en una preparación tal como una solución y, en general, se formula en una solución para inyección o similar que contiene ADN que codifica el péptido descrito anteriormente de la presente invención como principio eficaz. También puede añadirse a ésta un excipiente usado comúnmente según sea necesario. En los casos de un liposoma o liposoma de fusión de membrana (virus Sendai (VHJ)-liposoma o similar) que contiene ADN, el liposoma puede formularse dentro de una preparación de liposomas tal como una suspensión, preparación congelada o preparación congelada concentrada mediante centrifugación.

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 a ésta. 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 éste y el polinucleótido bicatenario compuesto de estos polinucleótidos monocatenarios. Cuando se prepara un polinucleótido que codifica el polipéptido usado en la presente invención, se selecciona apropiadamente cualquiera de estas secuencias de bases y los expertos en la técnica pueden llevar a cabo la selección fácilmente.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora de forma más concreta por medio de ejemplos.

Ejemplo 1: Obtención de proteína antigénica cancerosa novedosa mediante el método SEREX

(1) Preparación de biblioteca de ADNc

Se extrajo ARN total de testículos de un perro mediante el método de ácido-guanidinio-fenolcloroformo y se purificó ARN poli(A) usando el *kit* Oligotex-dT30 mRNA purification Kit (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit.

Usando el ARNm obtenido (5 µg), se sintetizó una biblioteca de ADNc en fago. Para la preparación de una biblioteca de ADNc en fago, se usaron los kits cDNA Synthesis Kit, Zap-cDNA Synthesis Kit y ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (fabricado por STRATAGENE) de acuerdo con los protocolos adjuntos a los kits. El tamaño de la biblioteca de ADNc en fago preparada fue de 1×10^6 ufp/ml.

(2) Exploración de la biblioteca de ADNc con suero

Usando la biblioteca de ADNc en fago así preparada, se llevó a cabo una inmunoexploración. Más específicamente, la *E. coli* anfitriona (XL1-Blue MRF') se infectó con la biblioteca de modo que aparecieron 2340 clones en una placa de

agarosa NZY con un tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm y se cultivó a 42 °C durante 3 a 4 horas para permitir que el fago formase placas. La placa se cubrió con una membrana de nitrocelulosa (Hybond C Extra: fabricada por GE Healthcare Bio-Science) impregnada con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) a 37 °C durante 4 horas para permitir la inducción y expresión de proteínas y las proteínas se transfirieron a la membrana. Posteriormente, la membrana se recuperó y se sumergió en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) complementado con leche deshidratada desgrasada al 0,5 %. La membrana se agitó después a 4 °C durante toda la noche para suprimir reacciones inespecíficas. Este filtro se dejó reaccionar después con suero de perro paciente diluido 500 veces a temperatura ambiente durante 2 o 3 horas.

Al igual que el suero de perro paciente descrito anteriormente, se usó suero de un perro paciente con un tumor perianal. El suero se almacenó a -80 °C y se pretrató inmediatamente antes de su uso. El método del pretratamiento del suero fue de la forma siguiente. Esto es, la *E. coli* anfitriona (XL1-Blue MRF') se infectó con fago λ ZAP Express, que no tiene ningún gen exógeno insertado, y después se cultivó en medio en medio NZY en placa a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se añadió a la placa tampón NaHCO₃ 0,2 M (pH 8,3) complementado con 0,5 M NaCl y la placa se dejó permanecer a 4 °C durante 15 horas, seguido de la recogida del sobrenadante como extracto de *E. coli*/fago. A partir de ahí, el extracto de *E. coli*/fago se hizo pasar a través de una columna NHS (fabricada por GE Healthcare Bio-Science) para inmovilizar acto seguido las proteínas procedentes de *E. coli*/fago. El suero del perro paciente se hizo pasar y reaccionar con esta columna de proteína inmovilizada para eliminar los anticuerpos que se adsorben sobre *E. coli* y/o fago. La fracción de suero que pasó a través de la columna se diluyó 500 veces con TBS complementado con leche deshidratada desgrasada al 5 % y el diluyente resultante se usó como material para la inmunoexploración.

La membrana sobre la que se transfirieron el suero así tratado y la proteína de fusión descrita anteriormente se lavó 4 veces con TBS-T (Tween 20 al 0,05 %/TBS) y se hizo reaccionar con IgG de cabra anti-perro (conjugado Goat anti Dog IgG-h+I HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) diluido 5.000 veces con TBS complementado con leche deshidratada desgrasada al 5 % como anticuerpo secundario, a temperatura ambiente durante 1 hora seguido de detección mediante reacción colorimétrica enzimática usando una solución de reacción NBT/BCIP (fabricada por Roche). Las colonias en las posiciones correspondientes a los sitios con reacción colorimétrica positiva se recuperaron de la placa de agarosa NZY que tenía un tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm y se disolvieron en 500 µl de tampón SM (NaCl 100 mM, MgClSO₄ 10 mM, Tris-HCl 50 mM, gelatina al 0,01 %; pH 7,5). La exploración se repitió como segunda y tercera exploración de la misma manera descrita anteriormente hasta que se obtuvo una única colonia con reacción colorimétrica positiva. El aislamiento del clon positivo único se logró después de explorar 9110 clones de fago reactivos con la IgG del suero.

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

Para someter al clon positivo único aislado mediante el método descrito anteriormente a análisis de la secuencia de bases, se llevó a cabo una operación de conversión del vector de fago a un vector de plásmido. Más específicamente, se mezclaron 200 µl de una solución preparada de modo que la *E. coli* anfitriona (XL1-Blue MRF') estuviera contenida a una absorbancia de DO₆₀₀ de 1,0 con 100 µl de una solución de fago purificado y después con 1 µl de fago auxiliar ExAssist (fabricado por STRATAGENE) y después se dejó proseguir la reacción a 37°C durante 15 minutos. Esto se siguió de la adición de 3 ml de medio LB a la mezcla de reacción y se realizó el cultivo 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. El cultivo se centrifugó después a 4°C, 1.000 xg durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante como una solución de fagémido. Posteriormente, se mezclaron 200 µl de una solución preparada de modo que la *E. coli* anfitriona del fagémido (SOLR) estuviera contenida a una absorbancia de DO₆₀₀ de 1,0 con 10 µl de una solución de fago purificado y se dejó proseguir la reacción a 37°C durante 15 minutos. A partir de ahí, se sembraron en placa 50 µl de la mezcla de reacción en medio de agar LB complementado con ampicilina (concentración final: 50 µg/ml), y se realizó el cultivo a 37°C durante toda la noche. Se recuperó una única colonia de SOLR transformada y se cultivó en medio LB complementado con ampicilina (concentración final: 50 µg/ml) a 37 °C, seguido de purificación del ADN de plásmido que tenía el inserto de interés usando QIAGEN plasmid Miniprep Kit (fabricado por Qiagen).

El plásmido purificado se sometió a análisis de la secuencia de longitud completa del inserto mediante el método del paseo con cebador usando el cebador de T3 de las SEQ ID NO: 13 y el cebador de T7 de la SEQ ID NO:14. Mediante este análisis de secuencia, se obtuvo el gen de la SEQ ID NO:1. Usando la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de este gen, se llevó a cabo una búsqueda de homología frente a genes conocidos usando un programa de homología de secuencias BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Como resultado, se reveló que el gen obtenido es el gen KATNAL1 humana, que es un factor homólogo humano de KATNAL1 de perro, tuvo una identidad de secuencia del 95 % en cuanto a la secuencia de bases y del 98 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos; La KATNAL1 de ratón, que es un factor homólogo de ratón, tuvo una identidad de secuencia del 85 % en cuanto a la secuencia de bases y del 94 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos; la KATNAL1 bovina, que es un factor homólogo de bovino, tuvo una identidad de secuencia del 91 % en cuanto a la secuencia de bases y del 97 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos; la KATNAL1 equina, que es un factor homólogo equino, tuvo una identidad de secuencia del 87 % en cuanto a la secuencia de bases y del 88 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos; y la KATNAL1 de pollo, que es un factor homólogo de pollo, tuvo una identidad de secuencia del 81 % en cuanto a la secuencia de bases y del 90 % en cuanto a la secuencia de aminoácidos; La secuencia de bases y la secuencia de

aminoácidos de KATNAL1 humana se muestran en la SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, respectivamente; La secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de KATNAL1 de ratón se muestran en la SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, respectivamente; La secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de KATNAL1 bovina se muestran en la SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, respectivamente; La secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de KATNAL1 equina se muestran en la SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, respectivamente; y la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de KATNAL1 de ratón se muestran en la SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:6, 12, respectivamente.

(4) Análisis de la expresión en diversos tejidos

La expresión de los genes obtenidos mediante el método anterior en tejidos normales de perro, ser humano y ratón y en diversas líneas celulares se investigó mediante el método de RT-PCR (transcripción inversa-PCR). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo de la forma siguiente. Esto es, se extrajo ARN total de entre 50 y 100 mg de cada tejido o entre 5×10^6 y 10×10^6 células de cada línea celular, usando el reactivo TRIZOL(fabricado por Invitrogen) de acuerdo con el protocolo descrito en las instrucciones adjuntas. Usando este ARN total, se sintetizó ADNc con el sistema Superscript First-Strand Synthesis System para RT-PCR (fabricado por Invitrogen) de acuerdo con el protocolo descrito en las instrucciones adjuntas. Como ADNc de tejidos humanos normales (cerebro, hipocampo, testículo, colon y placenta), se usaron Gene Pool cDNA (fabricado por Invitrogen), QUICK-Clone cDNA (fabricado por CLONETECH) y Large-Insert cDNA Library (fabricado por CLONETECH). La reacción de PCR se llevó a cabo usando cebadores específicos para el gen obtenido (los cebadores de perro que se muestran en las SEQ ID NO:15 and 16, los cebadores humanos que se muestran en las SEQ ID NO:17 y 18 y los cebadores de ratón que se muestran en las SEQ ID NO:19 y 20) tal como se describe más adelante. Esto es, los reactivos y el tampón adjunto se mezclaron de modo que 0,25 µl de la muestra preparada mediante la reacción de transcripción inversa, 2 µM 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 µl 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 termociclador (fabricado por BIO RAD). Como control para la comparación se usaron al mismo tiempo cebadores específicos para GAPDH (los cebadores de GAPDH de perro y ser humano se muestran en las SEQ ID NO:21 y 22; y los cebadores de la GAPDH de ratón se muestran en las SEQ ID NO:23 y 24). Como resultado, tal como se muestra en la fig. 1, el gen de KATNAL1 de perro no se expresó en la mayoría de los tejidos de perro sanos, mientras que el gen se expresó intensamente en los tejidos de tumor de perro. También en cuanto a los genes de KATNAL1 de ratón y ser humano, la expresión no se observó en la mayoría de los tejidos de ratón y humanos normales, mientras que la expresión se detectó en la mayoría de las líneas celulares de cáncer (fig. 2 y 3), al igual que en el caso del gen de KATNAL1 de perro.

(5) Análisis cuantitativo de la expresión en diversos tejidos

El gen obtenido mediante el método anterior se sometió a investigación de la expresión en tejidos normales humanos mediante el método de RT-PCR (transcripción inversa-PCR) cuantitativa. Al igual que los ADNc de tejidos normales y tejidos de cáncer humanos, se usó el panel I del Tissue scan Real Time para seguimiento del cáncer (fabricado por ORIGENE). La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo usando el termociclador CFX96 Real Time System - C1000, fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc. La reacción de PCR se llevó a cabo de la forma siguiente usando cebadores específicos para el gen obtenido (que se muestran en las SEQ ID NO:17 and 18). Esto es, se mezclaron 5 µl de la muestra de ADNc, 2 µM de cada uno de los cebadores, y los reactivos y el tampón contenido en la premezcla 2 x SYBR Premix Ex TaqII polymerase (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) para preparar una mezcla en un volumen final de 20 µl 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 KATNAL1 en cada uno de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de hígado, cáncer de próstata y cáncer de pulmón no fue menos de 5 veces superior al nivel de expresión en su tejido normal correspondiente. Basándose en estos resultados, puede esperarse que no hay ninguna preocupación en absoluto sobre la aparición de efectos secundarios por agentes antitumorales dirigidos a KATNAL1 human en tejidos normales y que el beneficio del efecto farmacológico de los agentes supera ampliamente el riesgo de sus efectos secundarios.

Ejemplo 2: Análisis de la antigenicidad en cáncer de KATNAL1 *in vivo*

(1) Preparación de vector recombinante que expresa KATNAL1 *in vivo*

Basándose en la secuencia de bases de la SEQ ID NO:5, se preparó un vector recombinante que expresa KATNAL1 *in vivo*. La PCR se preparó a partir de la línea celular de cáncer de ratón N2a (adquirida de ATCC), que mostró la expresión del ejemplo 1. Los reactivos y el tampón adjunto se mezclaron de modo que 1 µl del ADNc, 0,4 µM de cada uno de dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción de *HindIII* y *XbaI* (mostrados en las SEQ ID NO:25 y 26), dNTP 0,2 mM y 1,25 U de polimerasa U PrimeSTAR HS (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) estaban contenidos en la mezcla resultante en un volumen final de 50 µl y la PCR se llevó a cabo mediante 30 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 4 minutos usando un termociclador (fabricado por BIO RAD). Los dos tipos de cebadores descritos anteriormente fueron los de la amplificación de la región que codifica la longitud total de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5. Después de la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis usando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de alrededor de 1500 pb

usando el *kit* QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por QIAGEN).

El fragmento de ADN purificado se ligó en un vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante y después se recuperaron los plásmidos. Se confirmó mediante secuenciación que la secuencia del fragmento génico amplificado era la misma que la secuencia de interés. El plásmido que tenía la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción HindIII y XbaI y se purificó usando QIAquick Gel Extraction Kit, seguido de la inserción de la secuencia génica de interés en un vector de expresión de mamífero pcDNA3.1 (fabricado por Invitrogen) que se había tratado con las enzimas de restricción HindIII y XbaI. El uso de este vector permite la producción de proteína KATNAL1 en células de mamífero.

A 100 µg del ADN así preparado se añadieron 50 µg de partículas de oro (fabricadas por Bio Rad), 100 µl de espermidina (fabricada por SIGMA) y 100 µl de CaCl₂ 1 M (fabricado por SIGMA) y la mezcla resultante se agitó mediante agitación con formación de vórtice durante toda la noche, seguido de dejar la mezcla permanecer durante 10 minutos a temperatura ambiente (las partículas resultantes se denominan de aquí en adelante como las partículas de oro-ADN). La mezcla se centrifugó después a 3000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante, seguido de enjuagado del precipitado 3 veces con etanol al 100 % (fabricado por WAKO). Se añadieron 6 ml de etanol al 100 % a las partículas de oro-ADN y la mezcla resultante se agitó suficientemente mediante agitación con formación de vórtice, seguido de vertido de las partículas de oro-ADN en tubo Tefzel (fabricado por Bio Rad) y permitir a las partículas precipitar sobre la superficie de la pared. El etanol se eliminó mediante secado al aire del tubo Tefzel al cual se habían adherido las partículas de oro-ADN y el tubo se cortó después en trozos que tenían una longitud que es apropiada para una pistola génica.

(2) efecto antitumoral de KATNAL1 mediante el método de la vacuna de ADN

El tubo preparado anteriormente se fijó en una pistola génica y la vacuna de ADN se administró por vía transdérmica, mediante 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 individuos de ratones A/J (machos de 7 semanas, adquiridos de Japan SLC) y ratones Balb/c (machos de 7 semanas, adquiridos de Japan SLC) cuyo pelo se había rasurado (esto corresponde a la inoculación de 2 µg/individuo del ADN de plásmido). A partir de ahí, se trasplantó una línea celular N2a de neuroblastoma de ratón o una línea celular CT26 de cáncer de colon a cada ratón en una cantidad de 1×10^6 células para evaluar el efecto antitumoral (modelo profiláctico). Para cada modelo, el ADN de plásmido que no contenía ningún gen KATNAL1 insertado se administró a 10 individuos de ratón para proporcionar un control.

El efecto antitumoral se evaluó basándose en el tamaño del tumor (eje mayor $\times$ eje menor² / 2) y la proporción de ratones vivos. Como resultado de este estudio, en el modelo profiláctico usando la línea celular de neuroblastoma, el tamaño del tumor llegó a ser de 2886 mm³ y 659 mm³ el día 43 en el grupo de control y el grupo al que se administró plásmido de KATNAL1, respectivamente. Por lo tanto, se observó una regresión notable del tumor en el grupo al que se administró plásmido de KATNAL1. 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 murieron hacia el día 76 después de la administración en el grupo de control, mientras que el 60 % de los ratones sobrevivieron en el grupo al que se administró plásmido de KATNAL1. Estos resultados indican un efecto antitumoral significativo en el grupo al que se administró plásmido de KATNAL1 en comparación con el grupo de control. De forma similar, en el modelo profiláctico usando la línea celular de cáncer de colon, el tamaño del tumor llegó a ser de 2598 mm³ y 763 mm³ el día 35 en el grupo de control y el grupo al que se administró plásmido de KATNAL1, respectivamente. Por lo tanto, se observó una regresión notable del tumor en el grupo al que se administró plásmido de KATNAL1. Además, como resultado de la observación de la supervivencia, se encontró que todos los casos murieron hacia el día 50 después de la administración en el grupo de control, mientras que el 50 % de los ratones sobrevivieron en el grupo al que se administró plásmido de KATNAL1. Estos resultados indican un efecto antitumoral significativo en el grupo al que se administró plásmido de KATNAL1 en comparación con el grupo de control.

Ejemplo 3: Preparación de proteína KATNAL1 recombinante humana y evaluación de su capacidad inmunoadyuvante

(1) Preparación de proteína KATNAL1 recombinante humana

Basándose en la secuencia de bases de la SEQ ID NO:3, se preparó una proteína KATNAL1 recombinante humana. Los reactivos y el tampón adjunto se mezclaron de modo que 1 µl del ADNc preparado en el ejemplo 1 cuya expresión pudo confirmarse para 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 de *EcoRI* y *XhoI* (mostrados en las SEQ ID NO:27 y 28), dNTP 0,2 mM y 1,25 U de polimerasa U PrimeSTAR HS (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) estaban contenidos en la mezcla resultante en un volumen final de 50 µl y la PCR se llevó a cabo mediante 30 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 4 minutos usando un termociclador (fabricado por BIO RAD). Los dos tipos de cebadores descritos anteriormente fueron los de la amplificación de la región que codifica la longitud total de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4. Después de la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis usando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de alrededor de 1500 pb usando el *kit* QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por QIAGEN).

El fragmento de ADN purificado se ligó en un vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante y después se recuperaron los plásmidos. Se confirmó mediante secuenciación que la secuencia del fragmento génico amplificado era la misma que la secuencia de interés. El plásmido que tenía la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI y se purificó usando el kit QIAquick Gel Extraction Kit, seguido de inserción de la secuencia génica de interés dentro de 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 con un marcador de His. Se transformó *E. coli* BL21 (DE3) para expresión con este plásmido y se indujo la expresión con IPTG 1 mM, para permitir la expresión de la proteína de interés en *E. coli*.

(2) Purificación de proteína KATNAL1 recombinante humana

La *E. coli* recombinante así obtenida que expresa la SEQ ID NO:4 se cultivó en medio LB complementado con 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó alrededor de 0,7 y después se añadió al cultivo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido a 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 posteriormente a centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos, para lavar las células bacterianas.

Las células bacterianas se suspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y se sometieron a tratamiento ultrasónico en hielo. El líquido obtenido mediante el tratamiento ultrasónico 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.

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 proteasas.

El residuo se suspendió en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) complementado con clorhidrato de guanidinio 6 M y cloruro sódico 0,15 M y se dejó permanecer a 4 °C durante 20 horas para desnaturalizar proteína. A partir de ahí, la suspensión se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos y la fracción soluble obtenida se colocó en una columna de quelato de níquel preparada mediante un método convencional (portador: Chelating Sepharose (marca registrada) Fast Flow (GE Health Care); volumen de columna: 5 ml; tampón de equilibrado: Tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) complementado con clorhidrato de guanidinio 6 M y cloruro sódico 0,15 M), seguido de dejar el resultante permanecer a 4 °C durante toda la noche para permitir la adsorción al portador de níquel quelado. El portador de la columna se centrifugó después a 1500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante resultante se recuperó. El portador de la columna se suspendió después en solución salina tamponada con fosfato y se recargó dentro de la columna.

La fracción no adsorbida en la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón acetato 0,1 M (pH 4,0) complementado con cloruro sódico 0,5 M e, inmediatamente después, se llevó a cabo la elución con tampón acetato 0,1 M (pH 3,0) complementado con cloruro sódico 0,5 M para obtener una fracción purificada, la cual se usó más tarde como material para un ensayo de administración. La presencia de la proteína de interés en cada fracción eluida se confirmó mediante tinción de Coomassie llevada a cabo de acuerdo con un método convencional.

El tampón de la fracción purificada obtenida mediante el método anterior se reemplazó con un tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM (pH 8,0)) y la muestra resultante se sometió a escisión del marcador de His con proteasa factor Xa y purificación de la proteína de interés, usando el kit Factor Xa Cleavage Capture Kit (fabricado por Novagen) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Posteriormente, el tampón de 12 ml de la preparación purificada obtenida mediante el método anterior se reemplazó con 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 filtros Acrodisc de 0,22 µm con HT Tuffryn (fabricados por PALL) y usados en el experimento.

(3) inducción de linfocitos T citotóxicos CD8 positivos reactivos con proteína KATNAL1 recombinante humana

Se separó sangre periférica de un individuo sano y la sangre periférica se depositó sobre medio de separación de linfocitos (OrganonTeknika, Durham, NC), seguido de centrifugación del producto resultante a 1,500 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recuperó una fracción que contenía células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) y se la 3 (o más veces) en tampón fosfato frío para obtener CMNSP. Las CMNSP obtenidas se resuspendieron en 20 ml de medio AIM-V (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, EE.UU.) y se permitió a las células adherirse a un matraz de cultivo (Falcon) a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 2 horas. Las células no adherentes se usaron para la preparación de linfocitos T y las células adherentes se usaron para la preparación de células dendríticas.

Por otra parte, las células adherentes se cultivaron en medio AIM-V en presencia de IL-4 (1000 U/ml) y GM-CSF (1000 U/ml). Las células no adherentes obtenidas 6 días más tarde se recogieron y la proteína KATNAL1 recombinante humana se añadió a las células a una concentración de 10 µg/ml, seguido de cultivo de las células a 37 °C en CO₂ al 5

% durante 4 horas. A partir de ahí, el medio se reemplazó con medio AIM-V complementado con IL-4 (1000 U/ml), GM-CSF (1000 U/ml), IL-6 (1000 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA), IL-1 β (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 adicionales para obtener una población de células no adherentes para usarse como células dendríticas.

Las células dendríticas preparadas se resuspendieron en medio AIM-V a una densidad celular de 1×10^6 células/ml y la proteína KATNAL1 recombinante humana se añadió de nuevo a la suspensión a una concentración de 10 μ g/ml. Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 4 horas usando una placa de 96 pocillos. Después del cultivo, se llevó a cabo irradiación con rayos X (3000 rad) y las células se lavaron con medio AIM-V, seguido de suspensión en medio AIM-V complementado con suero AB humano al 10 % (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 1×10^5 células/pocillo. Además, la población de linfocitos T preparada se añadió a cada pocillo en una cantidad de 1×10^6 células y se cultivó a 37 °C en CO₂ al 5 %. Cada sobrenadante del cultivo se eliminó 7 días más tarde y las células dendríticas obtenidas de la misma manera que la descrita anteriormente mediante tratamiento con la proteína humana y la posterior irradiación con rayos X se suspendieron en medio AIM-V complementado con suero AB humano al 10 % (Nabi, Miami, FL), IL-7 (10 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA) e IL-2 (10 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA) (densidad celular, 1×10^5 células/ml). La suspensión resultante se añadió a la placa de 24 pocillos en una cantidad de 1×10^5 células/pocillo, y las células se cultivaron posteriormente. Después de repetir la misma operación de 4 a 6 veces a intervalos de 7 días, se recobraron linfocitos T estimulados y la inducción de linfocitos T CD8 positivos se confirmó mediante citometría de flujo.

Como control negativo, se usó una proteína que tiene una secuencia que está fuera del alcance de la presente invención (SEQ ID NO:29).

Posteriormente, se estudió si los linfocitos T CD8 positivos estimulados con el presente polipéptido pueden dañar las células tumorales con expresión.

En un tubo de centrifuga de 50 ml, se recogieron 10^5 células de una línea celular de tumor cerebral maligno, T98G (Stein GH et al., J. Cell Physiol., 99:43-54 (1979); adquirida de ATCC), en la cual se confirmó la expresión y se añadieron a las células 100 μ Ci de cromo 51, seguido de incubación de la mezcla resultante a 37 °C durante 2 horas. A partir de ahí, las células se lavaron 3 veces con medio AIM-V complementado con suero AB humano al 10 % (Nabi y se colocaron en una placa de 96 pocillos de fondo en V en una cantidad de 10^3 células por pocillo. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 10^5 , 5×10^4 , 2.5×10^4 o 1.25×10^4 linfocitos T CD8 positivos que se estimularon con la proteína recombinante humana y se suspendieron en medio AIM-V complementado con suero AB humano al 10 % y el cultivo se llevó a cabo a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 4 horas. A partir de ahí, La cantidad de cromo 51 liberado a partir de las células tumorales dañadas en el sobrenadante del cultivo se midió usando un contador gamma para calcular la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 positivos estimulados con la proteína recombinante humana.

Como resultado, se encontró que los linfocitos T CD8 positivos estimulados con la proteína recombinante humana tenían actividad citotóxica contra T98G. Por otra parte, los linfocitos T CD8 positivos inducidos usando la proteína de control negativo (SEQ ID NO:29) no mostraron actividad citotóxica. Por lo tanto, se reveló que la proteína recombinante humana usada en la presente invención tiene capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos CD8 positivos que pueden dañar las células tumorales.

La actividad citotóxica significa la actividad citotóxica de linfocitos T citotóxicos CD8 positivos contra T98G determinada mediante: mezclar 10^5 linfocitos T citotóxicos CD8 positivos estimulados e inducidos tal como se ha descrito anteriormente, con 10^3 células de la línea celular de tumor cerebral maligno T98G en la cual se incorporó cromo 51; cultivar la mezcla resultante durante 4 horas; medir la cantidad de cromo 51 liberado al medio después del cultivo; y después realizar el cálculo de acuerdo con la ecuación 1.

Ecuación 1: Actividad citotóxica (%) = cantidad de cromo 51 liberado de T98G después de la adición de linfocitos T CD8 positivos (cpm) / cantidad de cromo 51 liberado de las células diana tras la adición de ácido clorhídrico 1 N (cpm) x 100.

Aplicabilidad industrial

La presente invención es útil para la terapia y/o profilaxis del cáncer ya que la presente invención proporciona un agente inmunoadyuvante que contiene un polipéptido que ejerce actividad antitumoral contra diversos cánceres

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TORAY INDUSTRIES, INC.

<120> Agente inmunoadyuvante

<130> 12068

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.1

5

<210> 1

<211> 1760

<212> ADN

<213> *Canis familiaris*

10

<220>

<221> CDS

<222> (97)..(1569)

<223>

15

<400> 1

```

gccgccccag ctgcagggcc tcgggcctgc ggcgcctctg accctcccag gttgctgctg      60
ccgctcgggtg ccgaacctgt aggtctctgc aagaag atg aat ttg gct gag att      114
                                     Met Asn Leu Ala Glu Ile
                                     1                               5

tgt gac aat gca aag aaa gga aga gaa tat gca ctt ctt ggg aac tat      162
Cys Asp Asn Ala Lys Lys Gly Arg Glu Tyr Ala Leu Leu Gly Asn Tyr
                        10                        15                        20

gac tca tca atg gta tat tac cag ggg gtg ata cag cag att cag aga      210
Asp Ser Ser Met Val Tyr Tyr Gln Gly Val Ile Gln Gln Ile Gln Arg
                        25                        30                        35

cat tgc cag tca gtc aga gac cca gct gtc aaa ggc aaa tgg caa cag      258
His Cys Gln Ser Val Arg Asp Pro Ala Val Lys Gly Lys Trp Gln Gln
                        40                        45                        50

gtt cgg cag gaa tta ttg gaa gaa tat gaa caa gtt aaa aac att gtc      306
Val Arg Gln Glu Leu Leu Glu Glu Tyr Glu Gln Val Lys Asn Ile Val
55                        60                        65                        70

agc act ttg gag agt ttt aaa atg gac aag ccc cca gat ttc cct gtg      354
Ser Thr Leu Glu Ser Phe Lys Met Asp Lys Pro Pro Asp Phe Pro Val
                        75                        80                        85

tcc tgt caa gat gaa cca ttt aga gat cct gct gtt tgg cca ccc cct      402
Ser Cys Gln Asp Glu Pro Phe Arg Asp Pro Ala Val Trp Pro Pro Pro
                        90                        95                        100

gta cct gca gaa cac aga gct cca cct cag ata agg cgt ccc aat cga      450
Val Pro Ala Glu His Arg Ala Pro Pro Gln Ile Arg Arg Pro Asn Arg
                        105                        110                        115

gaa gta aga cct ctg agg aaa gaa atg cca gga gta gga gcc cgg gga      498
Glu Val Arg Pro Leu Arg Lys Glu Met Pro Gly Val Gly Ala Arg Gly
                        120                        125                        130

cct gta ggc cga gca cat cct ata tca aag ggt gaa aaa ccc tct aca      546
Pro Val Gly Arg Ala His Pro Ile Ser Lys Gly Glu Lys Pro Ser Thr

```

ES 2 595 161 T3

135	140	145	150	
agt aga gac aag gat tat aga gca aga gga aga gat gat aag gga agg Ser Arg Asp Lys Asp Tyr Arg Ala Arg Gly Arg Asp Asp Lys Gly Arg 155 160 165				594
aag aat atg cat gat ggt gcg agc gat ggt gaa att cct aaa ttt gat Lys Asn Met His Asp Gly Ala Ser Asp Gly Glu Ile Pro Lys Phe Asp 170 175 180				642
ggt gct ggg tat gat aag gat ctg gtg gaa gcc ctg gag aga gac att Gly Ala Gly Tyr Asp Lys Asp Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Asp Ile 185 190 195				690
gta tcc agg aat ccc agc att cat tgg gat gac ata gca gat ctg gaa Val Ser Arg Asn Pro Ser Ile His Trp Asp Asp Ile Ala Asp Leu Glu 200 205 210				738
gaa gct aag aag ttg cta agg gaa gct gtt gtt ctt cca atg tgg atg Glu Ala Lys Lys Leu Arg Glu Ala Val Leu Pro Met Trp Met 215 220 225 230				786
cct gac ttt ttc aaa ggg att aga agg cca tgg aag ggt gta ctg atg Pro Asp Phe Phe Lys Gly Ile Arg Arg Pro Trp Lys Gly Val Leu Met 235 240 245				834
gtt gga ccc ccg gcc act ggt aag act atg cta gct aaa gct gtt gcc Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Met Leu Ala Lys Ala Val Ala 250 255 260				882
act gaa tgt ggc aca aca ttc ttc aat gtt tca tct tct aca ctg aca Thr Glu Cys Gly Thr Thr Phe Phe Asn Val Ser Ser Ser Thr Leu Thr 265 270 275				930
tct aaa tat aga ggt gaa tct gag aag tta gtc cgt ctg ttg ttt gaa Ser Lys Tyr Arg Gly Glu Ser Glu Lys Leu Val Arg Leu Leu Phe Glu 280 285 290				978
atg gct aga ttt tat gcg ccc act acg atc ttc atc gat gaa ata gat Met Ala Arg Phe Tyr Ala Pro Thr Thr Ile Phe Ile Asp Glu Ile Asp 295 300 305 310				1026
tct atc tgt agt cga aga gga acc tca gat gaa cat gag gca agt cgc Ser Ile Cys Ser Arg Arg Gly Thr Ser Asp Glu His Glu Ala Ser Arg 315 320 325				1074
aga gtc aag tct gaa cta ctc att cag atg gat gga gtt gga gga gct Arg Val Lys Ser Glu Leu Leu Ile Gln Met Asp Gly Val Gly Gly Ala 330 335 340				1122
tta gag aat gat gat cct tcc aaa atg gtt atg gta ttg gcc gct act Leu Glu Asn Asp Asp Pro Ser Lys Met Val Met Val Leu Ala Ala Thr 345 350 355				1170
aat ttc cca tgg gac att gat gaa gct ttg aga agg aga tta gaa aag Asn Phe Pro Trp Asp Ile Asp Glu Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Lys 360 365 370				1218
agg ata tat ata cct ctc cca aca gca aaa gga aga act gag ctg ctg Arg Ile Tyr Ile Pro Leu Pro Thr Ala Lys Gly Arg Thr Glu Leu Leu 375 380 385 390				1266
aag att aat ctt cgt gaa gtt gaa ctg gat cct gac att caa ctg gaa				1314

Lys Ile Asn Leu Arg Glu Val Glu Leu Asp Pro Asp Ile Gln Leu Glu
395 400 405

gat ata gca gag aag ata gag ggc tat tct ggt gct gat ata act aat 1362
Asp Ile Ala Glu Lys Ile Glu Gly Tyr Ser Gly Ala Asp Ile Thr Asn
410 415 420

gtt tgc agg gat gcc tct tta atg gca atg aga cgg cga atc aat ggc 1410
Val Cys Arg Asp Ala Ser Leu Met Ala Met Arg Arg Arg Ile Asn Gly
425 430 435

tta ggt cca gaa gag atc cgt gca ctt tct aaa gag gaa ctt cag atg 1458
Leu Gly Pro Glu Glu Ile Arg Ala Leu Ser Lys Glu Glu Leu Gln Met
440 445 450

cct gtt acc aaa gga gac ttt gaa ttg gct ctt aag aaa att gct aag 1506
Pro Val Thr Lys Gly Asp Phe Glu Leu Ala Leu Lys Lys Ile Ala Lys
455 460 465 470

tct gtc tct gct gca gac ttg gag aag tat gaa aaa tgg atg gtc gaa 1554
Ser Val Ser Ala Ala Asp Leu Glu Lys Tyr Glu Lys Trp Met Val Glu
475 480 485

ttt gga tct gct tga atttctgtca gctctttcat ttctggtatt tttatttata 1609
Phe Gly Ser Ala
490

aaatgtgaag aaattccctg caattttttt aaaaaaaciaa gtttagaact tttcattgga 1669

gagacttttc ccttaaagga aaaaaccta aaccacaaag aatataaata tagctgggaa 1729

agaagaaaag cttacatagg gagcctgata g 1760

<210> 2

<211> 490

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 2

Met Asn Leu Ala Glu Ile Cys Asp Asn Ala Lys Lys Gly Arg Glu Tyr
1 5 10 15

Ala Leu Leu Gly Asn Tyr Asp Ser Ser Met Val Tyr Tyr Gln Gly Val
20 25 30

Ile Gln Gln Ile Gln Arg His Cys Gln Ser Val Arg Asp Pro Ala Val
35 40 45

Lys Gly Lys Trp Gln Gln Val Arg Gln Glu Leu Leu Glu Glu Tyr Glu
50 55 60

Gln Val Lys Asn Ile Val Ser Thr Leu Glu Ser Phe Lys Met Asp Lys
65 70 75 80

Pro Pro Asp Phe Pro Val Ser Cys Gln Asp Glu Pro Phe Arg Asp Pro
85 90 95

Ala Val Trp Pro Pro Pro Val Pro Ala Glu His Arg Ala Pro Pro Gln
 100 105 110
 Ile Arg Arg Pro Asn Arg Glu Val Arg Pro Leu Arg Lys Glu Met Pro
 115 120 125
 Gly Val Gly Ala Arg Gly Pro Val Gly Arg Ala His Pro Ile Ser Lys
 130 135 140
 Gly Glu Lys Pro Ser Thr Ser Arg Asp Lys Asp Tyr Arg Ala Arg Gly
 145 150 155 160
 Arg Asp Asp Lys Gly Arg Lys Asn Met His Asp Gly Ala Ser Asp Gly
 165 170 175
 Glu Ile Pro Lys Phe Asp Gly Ala Gly Tyr Asp Lys Asp Leu Val Glu
 180 185 190
 Ala Leu Glu Arg Asp Ile Val Ser Arg Asn Pro Ser Ile His Trp Asp
 195 200 205
 Asp Ile Ala Asp Leu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Leu Arg Glu Ala Val
 210 215 220
 Val Leu Pro Met Trp Met Pro Asp Phe Phe Lys Gly Ile Arg Arg Pro
 225 230 235 240
 Trp Lys Gly Val Leu Met Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Met
 245 250 255
 Leu Ala Lys Ala Val Ala Thr Glu Cys Gly Thr Thr Phe Phe Asn Val
 260 265 270
 Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ser Lys Tyr Arg Gly Glu Ser Glu Lys Leu
 275 280 285
 Val Arg Leu Leu Phe Glu Met Ala Arg Phe Tyr Ala Pro Thr Thr Ile
 290 295 300
 Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Arg Arg Gly Thr Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu His Glu Ala Ser Arg Arg Val Lys Ser Glu Leu Leu Ile Gln Met
 325 330 335
 Asp Gly Val Gly Gly Ala Leu Glu Asn Asp Asp Pro Ser Lys Met Val

340					345					350					
Met	Val	Leu	Ala	Ala	Thr	Asn	Phe	Pro	Trp	Asp	Ile	Asp	Glu	Ala	Leu
		355					360					365			
Arg	Arg	Arg	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Tyr	Ile	Pro	Leu	Pro	Thr	Ala	Lys
		370					375					380			
Gly	Arg	Thr	Glu	Leu	Leu	Lys	Ile	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Glu	Leu	Asp
385					390					395					400
Pro	Asp	Ile	Gln	Leu	Glu	Asp	Ile	Ala	Glu	Lys	Ile	Glu	Gly	Tyr	Ser
				405					410					415	
Gly	Ala	Asp	Ile	Thr	Asn	Val	Cys	Arg	Asp	Ala	Ser	Leu	Met	Ala	Met
				420					425					430	
Arg	Arg	Arg	Ile	Asn	Gly	Leu	Gly	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala	Leu	Ser
						440							445		
Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Met	Pro	Val	Thr	Lys	Gly	Asp	Phe	Glu	Leu	Ala
						455							460		
Leu	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Asp	Leu	Glu	Lys	Tyr
465					470							475			480
Glu	Lys	Trp	Met	Val	Glu	Phe	Gly	Ser	Ala						
				485					490						

<210> 3
<211> 7536
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (132)..(1604)
<223>

<400> 3

ES 2 595 161 T3

ccttttcacg cgcgtcgcga gctaacggac tcggcggcgg cggcggcggc ggcctgcgcc	60
ccaccgcac cccatctgga ccgcacgcgt gaatgtgcc ggacctgcgc cttctgggtc	120
tctgaaagaa g atg aat ttg gct gag att tgt gat aat gca aag aaa gga	170
Met Asn Leu Ala Glu Ile Cys Asp Asn Ala Lys Lys Gly	
1 5 10	
aga gaa tat gcc ctt ctt gga aat tac gac tca tca atg gta tat tac	218
Arg Glu Tyr Ala Leu Leu Gly Asn Tyr Asp Ser Ser Met Val Tyr Tyr	
15 20 25	
cag ggg gtg atg cag cag att cag aga cat tgc cag tca gtc aga gat	266

ES 2 595 161 T3

Gln Gly Val Met Gln Gln Ile Gln Arg His Cys Gln Ser Val Arg Asp	
30 35 40 45	
cca gct atc aaa ggc aaa tgg caa cag gtt cgg cag gaa tta ttg gag	314
Pro Ala Ile Lys Gly Lys Trp Gln Gln Val Arg Gln Glu Leu Leu Glu	
50 55 60	
gaa tat gaa caa gtt aaa agt att gtc agc act tta gaa agt ttt aaa	362
Glu Tyr Glu Gln Val Lys Ser Ile Val Ser Thr Leu Glu Ser Phe Lys	
65 70 75	
att gac aag cct cca gat ttc cct gtg tcc tgt caa gat gaa cca ttt	410
Ile Asp Lys Pro Pro Asp Phe Pro Val Ser Cys Gln Asp Glu Pro Phe	
80 85 90	
aga gat cct gct gtt tgg cca ccc cct gtt cct gca gaa cac aga gct	458
Arg Asp Pro Ala Val Trp Pro Pro Pro Val Pro Ala Glu His Arg Ala	
95 100 105	
cca cct cag atc agg cgt ccc aat cga gaa gta aga cct ctg agg aaa	506
Pro Pro Gln Ile Arg Arg Pro Asn Arg Glu Val Arg Pro Leu Arg Lys	
110 115 120 125	
gaa atg gca gga gta gga gcc cgg gga cct gta ggc cga gca cat cct	554
Glu Met Ala Gly Val Gly Ala Arg Gly Pro Val Gly Arg Ala His Pro	
130 135 140	
ata tca aag agt gaa aag cct tct aca agt agg gac aag gac tat aga	602
Ile Ser Lys Ser Glu Lys Pro Ser Thr Ser Arg Asp Lys Asp Tyr Arg	
145 150 155	
gca aga ggg aga gat gac aag gga agg aag aat atg caa gat ggt gca	650
Ala Arg Gly Arg Asp Asp Lys Gly Arg Lys Asn Met Gln Asp Gly Ala	
160 165 170	
agt gat ggt gaa atg cca aaa ttt gat ggt gct ggt tat gat aag gat	698
Ser Asp Gly Glu Met Pro Lys Phe Asp Gly Ala Gly Tyr Asp Lys Asp	
175 180 185	
ctg gtg gaa gcc ctt gaa aga gac att gta tcc agg aat cct agc att	746
Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Asp Ile Val Ser Arg Asn Pro Ser Ile	
190 195 200 205	
cat tgg gat gac ata gca gat ctg gaa gaa gct aag aag ttg cta agg	794
His Trp Asp Asp Ile Ala Asp Leu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Leu Arg	
210 215 220	
gaa gct gtt gtt ctt cca atg tgg atg cct gac ttt ttc aaa ggg att	842
Glu Ala Val Val Leu Pro Met Trp Met Pro Asp Phe Phe Lys Gly Ile	
225 230 235	
aga agg cca tgg aag ggt gta ctg atg gtt gga ccc cca ggc act ggt	890
Arg Arg Pro Trp Lys Gly Val Leu Met Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly	
240 245 250	
aaa act atg cta gct aaa gct gtt gcc act gaa tgt ggt aca aca ttc	938
Lys Thr Met Leu Ala Lys Ala Val Ala Thr Glu Cys Gly Thr Thr Phe	
255 260 265	
ttc aac gtt tcg tct tct aca ctg aca tct aaa tac aga ggt gaa tct	986
Phe Asn Val Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ser Lys Tyr Arg Gly Glu Ser	
270 275 280 285	

gag aag tta gtt cgt ctg ttg ttt gag atg gct aga ttt tat gcc cct Glu Lys Leu Val Arg Leu Leu Phe Glu Met Ala Arg Phe Tyr Ala Pro 290 295 300	1034
acc acg atc ttc att gat gag ata gat tct atc tgc agt cga aga gga Thr Thr Ile Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Arg Arg Gly 305 310 315	1082
acc tct gat gaa cat gag gca agt cgc agg gtc aag tct gaa ctg ctc Thr Ser Asp Glu His Glu Ala Ser Arg Arg Val Lys Ser Glu Leu Leu 320 325 330	1130
att cag atg gat gga gtt gga gga gct tta gaa aat gat gat cct tcc Ile Gln Met Asp Gly Val Gly Gly Ala Leu Glu Asn Asp Asp Pro Ser 335 340 345	1178
aaa atg gtt atg gta ttg gct gct act aat ttc ccg tgg gac att gat Lys Met Val Met Val Leu Ala Ala Thr Asn Phe Pro Trp Asp Ile Asp 350 355 360 365	1226
gaa gct ttg cga aga agg tta gaa aaa agg ata tat ata cct ctc cca Glu Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Lys Arg Ile Tyr Ile Pro Leu Pro 370 375 380	1274
aca gca aaa gga aga gct gag ctt ctg aag atc aac ctt cgt gag gtc Thr Ala Lys Gly Arg Ala Glu Leu Leu Lys Ile Asn Leu Arg Glu Val 385 390 395	1322
gaa tta gat cct gat att caa ctg gaa gat ata gcc gag aag att gag Glu Leu Asp Pro Asp Ile Gln Leu Glu Asp Ile Ala Glu Lys Ile Glu 400 405 410	1370
ggc tat tct ggt gct gac atc act aat gtt tgc agg gat gcc tct tta Gly Tyr Ser Gly Ala Asp Ile Thr Asn Val Cys Arg Asp Ala Ser Leu 415 420 425	1418
atg gca atg aga cgg cgt atc aat ggc tta agt cca gaa gaa atc cgt Met Ala Met Arg Arg Arg Ile Asn Gly Leu Ser Pro Glu Glu Ile Arg 430 435 440 445	1466
gca ctt tct aaa gag gaa ctt cag atg cct gtt acc aaa gga gac ttt Ala Leu Ser Lys Glu Glu Leu Gln Met Pro Val Thr Lys Gly Asp Phe 450 455 460	1514
gaa ttg gcc cta aag aaa att gct aag tct gtc tct gct gca gac ttg Glu Leu Ala Leu Lys Lys Ile Ala Lys Ser Val Ser Ala Ala Asp Leu 465 470 475	1562
gag aag tat gaa aaa tgg atg gtt gaa ttt gga tct gct tga Glu Lys Tyr Glu Lys Trp Met Val Glu Phe Gly Ser Ala 480 485 490	1604
atttctgtca gctctttaat ttctggtatt tttgttgata aaatacgaag aaattcctgc	1664
aatttttaaa aaacaagttt ggaatttttt tcagtgaggt ggttttcgct taaaggaaaa	1724
aaaaatctaa aactgcgaag aatactaaat gtagttgaga aataattgat ggcgagagtt	1784
tgctagtctc cctccccggc tttgtgtggt tattccacgt attcctgcat taatattgca	1844
cacccaaacc agtctatcag ggaggctgaa gcaagggcgc agtgtgatat tttaggaata	1904
cagaagattt agaaataccc ctattttotca tttgcagttt ttttttccaa ttctgtgtgc	1964

tgtcaacatg agggacctat ctatgtatgt tgacttttaa catcaaaatt ggatttgtgt	2024
caaacattca ttgttaagag aagaatgaca gtatattttg gaggaataa tgaatttact	2084
aattaaacct ttagaattta tgacttactg ttagagtctg tcatatgggtt agaattttta	2144
cttcogctac cctgocatt tottctgcta gctacttcat aatatcttga gctttactga	2204
ggaatattct cacgctctgt ggtatttgaa tcattttgcc aggtcatttc tctgtcttta	2264
gtattttttg ctgggtgctc ttacatttaa tatggaaagg tgggaagaat attactgcat	2324
tagatgtaat tcttcattct agacttccaa gtttggtttc acttttttgt gtgtgcgtga	2384
aggagtctgt gtcaccagc ctgtgtagt cagtgggtga tcttggctca ctgcaacctc	2444
tgccctctag attcaagcaa ttctcctgtc tcagcctccc aagtagctgg gattacaggt	2504
gcgcaccacc atgcctggct gtgttttcac ttttctttca acatgttcaa ccagatatat	2564
agccattatt tttctcagct ccagcattgt ttgatttttc ttgagtttga ttttagtatt	2624
tgagataaat acttttacat tctaaacaag tccactctct gtggctaacg caaaacaaat	2684
gaaatcttta ttgttttcca aacagctagt ttaacaaaac agcatcatac atagtgaatg	2744
atgttcattg gaaaattcta aaatttgtcc ttgtctaggt tgagaacttt tacacacact	2804
aagataaaga tagaaatctg acatgctcac tcaattcagc aggaattaca cattagaaag	2864
aagccagaaa aataaatggc atatatccaa tcacaagtaa atgatcctgg cgttagtttt	2924
tatgattaca tgtgtctcat taggcaattt atgctttaat ggtcaagctt ttaaaaattt	2984
gtatttgata acatcctgaa ttctcagttt cgaatagtgc ctactgggtt aaaactaaaa	3044
ataatacagc tttttggaca ttttaaccaag atactaagaa ggtttttttt aaaaaagag	3104
atttgattat ttttccctgc taaaaactgt aaatgcctta tgttcttttc agataactta	3164
agtctgacct aaactccagt attcatctga tgctgtaaat tgcccttctt tctgagacac	3224
agattataag atgccagatc ataagacatc atgattttat tgtaattgaa ttcttcctaa	3284
aaattgagag gtttcctttt attaaacttt aaaataaaga aataagtagt ttcattacga	3344
ttattttgca aactattgoc agtcagaaat gcactttttt tttccctgaa gttttaggag	3404
cogtcactaa aacattagtc ttgtgattgt taaaacttgt ttgtaatggg ttgggtgcaa	3464
agtaattgtg gtttttccat tactttcaat ggcaaaaacc gcaattactt ttgcaccagc	3524
ctaacaatag ttgattagtt agaccttttc tgggttttgt attgattatc ttgggtgtgca	3584
tttaattatt tttctgaatt cttcatggat aatgacatag taattgtgat tcttttaata	3644
ccagttaagc agtatttggc aacttaaact tcctgggagc ctaactttac tatgttaagt	3704
gagtcagggtg tgctttttat ttcccttggt tctcattttg ccctgtcagt ggatggtaga	3764
tgctttgtat atcttaaact ccttaaagga tcttaaagac atccctcagc tgttctattt	3824

aactttttatt	ttatttttatt	ttattttattt	atattttttg	agactgagtc	ttgctctgtc	3884
gcccaggctg	gagtgcagtg	gcatgatctc	ggctcactgc	aacttctgcc	ccccagggtc	3944
aagccattct	cctgcctcgg	cctcctgagt	agctgggatt	acagttgccg	ccacacccgg	4004
cttattttttt	tgtatttttta	gtagaggcag	agtttcacca	tgttgggccag	gctagtctcg	4064
aactcctgac	ctcagatgat	cggcccacat	tggcctccca	aagtgcctggg	attacaggtg	4124
tgatccaccg	cacctggccc	taacttttaa	tatacaacac	acacacacac	acacacacac	4184
acacacacac	acacacacac	acacacacac	acactatttc	agaagacagt	gtgttgccctt	4244
accagaatg	agtgcctagga	ttacaggcgt	gagacagaca	cacatacaca	cacatacaca	4304
cacacagagt	ctttattgca	gaagacagtg	tggtgcctta	taggcgtgag	acacacacac	4364
acacacacac	acacacacac	acacacacag	tctttattgc	agaagacagt	gtgttgccctt	4424
accagaatga	gtgcttggtg	tacaggcgtg	agccactgtg	cccagcccta	acttttaatg	4484
tacatcacac	acacactcac	actcacatac	acacacacac	acacactctg	actgtcttta	4544
ttgcagaaga	cagtgtgttg	ccttaccocag	aatgagattg	aattgttttg	cttcgttttg	4604
ttttgttatt	cagtgttgcg	gtagcagatg	cattatcaaa	ggaaaaatat	ttggctcctt	4664
taattcctct	gaaaacatga	gtattttgag	ttctgcagca	caatgactgt	aggactaagc	4724
taagtctgct	ttgcagatat	ctgatcagat	agtcocctca	ttctgtagac	gtgtattggt	4784
tggtccaaga	cacagtgagt	aggagctctg	tggaccaaga	caaagctgga	ctagagagta	4844
cagttcaaac	ttggcagttt	ctctaacgac	tctgtatagc	ttctggcttc	tactactgaa	4904
acaagagttt	agatcactga	tggagaggca	tagtaatctg	tttgtgcttt	ggaaaaatat	4964
ataaaagttt	ttttccoccta	ttttttgcac	tttaaactctg	ttttgaaatt	agaactgata	5024
tacattttatt	tgaataatgt	gtaactatta	tggatctatt	ttaatgaaca	atttttacca	5084
tttccaagc	tgocctgtta	ttataagcat	gacatgttta	ctataaacct	tttgccccc	5144
taattttctt	ttttaaagga	aattaatatt	agtaaaataa	acacctcttt	aatggaagct	5204
gcaaccttct	agtgatccaa	gtagacaata	gatgggtggc	tcacagactt	tatctacaca	5264
ctttcgggtc	tgaccactac	ctcccacaat	acctagccat	tttgggaagg	gaaaacatgc	5324
ggtggtctag	ctgtatagct	cagggcttaa	tttcagcttc	tgagattgtg	atgtcatatt	5384
tcactctcaa	aacataggct	gaaagcacga	attactcaaa	aagtaagcaa	accaatacct	5444
ggtgaatcta	tggacagtca	tacacataca	tcaggggaaa	atgtgtgtgt	acaacccaaa	5504
tttacagtat	gattgtcatt	ctttgacttt	gttttgtata	gcctgactct	gttgaacatg	5564
aaattattag	tactctaggt	tttggacagc	ttgagttcat	ttgaattcct	tccttaggaa	5624
taagttttta	tatacactgc	taaatgtgtg	atgagaatca	taaaacacta	accagctgag	5684
gtagctgtga	ttcactttcc	ccccacccta	acttgagata	aaatgaagga	ctaggcaagt	5744

atttcatgtt	gtgtgagtgg	acttcgggttc	cttcagttatt	gtctaggtta	ttgagtcctt	5804
ctttgcctaa	tagtggattc	ccactcttaa	gataactttt	attagtgata	aatcagttta	5864
gggtatattc	tgtatgacag	gcataaaatg	ttaaggggtga	atgctggcct	tttccaagaa	5924
aaggccacct	taacttgtat	gaggaaaaaa	tcctaactat	tcctcttttt	gtatcttttt	5984
ttcogtaact	gttttgattg	tatattttaa	agaaaccaat	taatttgtga	tgcacgtaat	6044
atttgtgtga	acctgagaat	atgtcacaat	aggaaaaagc	agaaattata	cttaggggac	6104
atgttagggg	ggtaaaaaata	tttaagcctc	gaatgtttta	ctgtcatctc	cactaactat	6164
ttttacagaa	aaagctaaaa	actctgttgt	aattattgta	agtttactta	tttatacttt	6224
taaattaggc	ttttcatact	taaatttttt	tgacatttgc	ttttaatatt	tgtttcttaa	6284
tgtggaaatt	gtgtattttta	ataatcaaat	tattaggata	atagatatat	ttttaaacat	6344
tcacctcatt	aacaaataga	tccttgaatt	tttattaggt	tttttggctc	cagacaactg	6404
tttagcttta	atgatatttc	taaattccca	gtgaacttatt	aataaaaaaca	ggaaaaatat	6464
ttaggtaatg	tcataaaaatt	tattttacct	ttctcatttt	ctgagaaaat	aatgaaaaaa	6524
aaccctagat	attgctttat	taccaacagt	gtgtaggttt	ttgtacatat	ggaaatttga	6584
cacaaaaaaaa	tagggaattt	gtatagagaa	gtttccctct	tataaaagga	ctcccatttg	6644
attgttcgaa	actataaaaat	gcacttttac	tttaoccatat	ctgaaatgac	aaaatatcgc	6704
cctttggaaa	acctgactct	ttgcaogtgt	aattoccaga	gtctaactca	gttaaccagg	6764
cttagtttta	ggcaggaatg	aattgaatta	aattcagttc	atcatctatg	cagatttggt	6824
tcttttaagc	acatccttcc	ctcctgctgt	tgcctctctc	ccattaactt	ttctttttta	6884
tcttgaaatt	gtttaaaata	ttccatcttt	ctttctctag	caaagtgttt	gtattccaaa	6944
taaggcctct	gtgaaatgtc	tgaattactt	ttcccgctct	tggtatggtc	agcttcatta	7004
tttgatgta	ttgcattcaa	agcagcagtt	ccaaacataa	cacacatcta	ttttcttaga	7064
gttttgtaaa	tacaaaactaa	cctgatgaca	ttaaaaattg	tggtatctac	atgttcctat	7124
gttcattctc	taaaaacctg	agtaacttta	tgaaaacaca	caaacctgga	aaaacatcac	7184
atttttgtca	catttttact	gacaaatgta	tattcatatg	atggtaacggc	agcagggagt	7244
ggccccagct	taacatggct	gtgagtggac	acagtgtctc	gcaggatcac	tgcattgtat	7304
gatggcttgt	aagtgcgttg	ttaagacttt	tgtttcagtg	tttgtctccc	agtatttgaa	7364
cctaatttaa	agaaaaagac	gtttccaagt	tgtatttatt	aaatgtgttt	ttccttacct	7424
tttgtgctgc	tactttgcta	atctcattag	cttagctgtg	tttgtgcata	ggtttatatt	7484
ggtaataaat	ttatagagtg	ttggttgtca	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aa	7536

5
 <210> 4
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

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

[illegible]

<210> 5
 <211> 6173
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (137)..(1603)
 <223>

<400> 5

```

agcgcgggcga cagactgata aattggggagc tactcagatg gtgttaaagt gactctttgt      60
ctgcagggggg ctccgggggtg gtcgctggat tgggcgctgt gcgtcgggcg ggggtagcgc      120
aggtgtotga aagaag atg aat ttg gcg gag att tgt gag aat gcg aag aaa      172
          Met Asn Leu Ala Glu Ile Cys Glu Asn Ala Lys Lys
              1              5              10

ggc cgg gaa tat gcg ctt ctg gga aat tat gac tcg tca atg gtg tat      220
Gly Arg Glu Tyr Ala Leu Leu Gly Asn Tyr Asp Ser Ser Met Val Tyr
              15              20              25

tac cag gga gtg ata cag cag atc cag aga cac tgc cag tca ctg aga      268
Tyr Gln Gly Val Ile Gln Gln Ile Gln Arg His Cys Gln Ser Leu Arg
              30              35              40

gac ccg gcc acc aaa gcc aag tgg cag cag gta cgg cag gaa ctc ttg      316
Asp Pro Ala Thr Lys Ala Lys Trp Gln Gln Val Arg Gln Glu Leu Leu
              45              50              55              60

gaa gaa tat gaa cag gtt aag agt atc gtc agc act tta gaa agc ttt      364
Glu Glu Tyr Glu Gln Val Lys Ser Ile Val Ser Thr Leu Glu Ser Phe
              65              70              75

aag atg gac aag ccc cct gac ttc ccc gtg tct tgc cga gat gaa ccg      412
Lys Met Asp Lys Pro Pro Asp Phe Pro Val Ser Cys Arg Asp Glu Pro
              80              85              90

ttt aga gac cct gca gta tgg cca ccc cct gtc cct gcg gaa cac aga      460
Phe Arg Asp Pro Ala Val Trp Pro Pro Pro Val Pro Ala Glu His Arg
              95              100              105

gca ccc cct caa atc agg cgt cca aat cgc gaa gtg agg cct ctg cgg      508
Ala Pro Pro Gln Ile Arg Arg Pro Asn Arg Glu Val Arg Pro Leu Arg
              110              115              120

aaa gac gtg ggg gca gga gcc cgg gga ctc gtg ggc cga gca cac cag      556
Lys Asp Val Gly Ala Gly Ala Arg Gly Leu Val Gly Arg Ala His Gln
              125              130              135              140

ata tcg aag agt gac aaa cct gca agt cgg gac aag gac tat aga gca      604
Ile Ser Lys Ser Asp Lys Pro Ala Ser Arg Asp Lys Asp Tyr Arg Ala
              145              150              155

aga ggg aga gat gac aag gca agg aaa aat gtg caa gat ggt gca agt      652
Arg Gly Arg Asp Asp Lys Ala Arg Lys Asn Val Gln Asp Gly Ala Ser
              160              165              170

```

gac agc gag att ccc aag ttt gat ggc gcc ggg tat gat aag gat ctg	700
Asp Ser Glu Ile Pro Lys Phe Asp Gly Ala Gly Tyr Asp Lys Asp Leu	
175 180 185	
gtg gaa gcc ctg gag agg gac att gtg tcc agg aac cct agc att cac	748
Val Glu Ala Leu Glu Arg Asp Ile Val Ser Arg Asn Pro Ser Ile His	
190 195 200	
tgg gat gac ata gca gac ctg gag gag gct aag aag ttg ctc cgg gaa	796
Trp Asp Asp Ile Ala Asp Leu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Leu Arg Glu	
205 210 215 220	
gct gtt gtc ctg ccc atg tgg atg cct gac ttt ttc aaa ggg att aga	844
Ala Val Val Leu Pro Met Trp Met Pro Asp Phe Phe Lys Gly Ile Arg	
225 230 235	
agg cca tgg aag ggt gtg ctg atg gtt ggc ccc cca ggc act ggt aag	892
Arg Pro Trp Lys Gly Val Leu Met Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys	
240 245 250	
act atg ctg gct aaa gcg gtt gcc act gaa tgt ggg aca acc ttt ttc	940
Thr Met Leu Ala Lys Ala Val Ala Thr Glu Cys Gly Thr Thr Phe Phe	
255 260 265	
aac gtg tcc tct tct acc ctg aca tct aag tac aga ggc gaa tct gag	988
Asn Val Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ser Lys Tyr Arg Gly Glu Ser Glu	
270 275 280	
aag ttg gtc cga ctg ttg ttt gaa atg gct agg ttc tat gcc cct acc	1036
Lys Leu Val Arg Leu Leu Phe Glu Met Ala Arg Phe Tyr Ala Pro Thr	
285 290 295 300	
acg atc ttc atc gac gaa att gat tct atc tgc agt cga aga ggg acg	1084
Thr Ile Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Arg Arg Gly Thr	
305 310 315	
tct gat gag cac gag gca agc cgc aga gtc aag tcg gag ctc ctc atc	1132
Ser Asp Glu His Glu Ala Ser Arg Arg Val Lys Ser Glu Leu Leu Ile	
320 325 330	
cag atg gat gga gtt gga gga gcc tta gaa aat gat gac cca tcc aaa	1180
Gln Met Asp Gly Val Gly Gly Ala Leu Glu Asn Asp Asp Pro Ser Lys	
335 340 345	
atg gtg atg gtc ctg gct gct acg aac ttt ccg tgg gac att gat gag	1228
Met Val Met Val Leu Ala Ala Thr Asn Phe Pro Trp Asp Ile Asp Glu	
350 355 360	
gct ctg cgc agg aga cta gag aaa agg att tac att cct ctc ccg aca	1276
Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Lys Arg Ile Tyr Ile Pro Leu Pro Thr	
365 370 375 380	
gca aaa gga aga gcg gag ctc ctg aag atc agc ctc cgg gag gta gag	1324
Ala Lys Gly Arg Ala Glu Leu Leu Lys Ile Ser Leu Arg Glu Val Glu	
385 390 395	
ctg gac ccc gat gtc cac ctg gag gac atc gcc gac aag acg gag ggc	1372
Leu Asp Pro Asp Val His Leu Glu Asp Ile Ala Asp Lys Thr Glu Gly	
400 405 410	
tac tcg ggt gcc gac atc act aac atc tgc agg gac gct tct ttg atg	1420
Tyr Ser Gly Ala Asp Ile Thr Asn Ile Cys Arg Asp Ala Ser Leu Met	
415 420 425	

gcg atg agg cgg cgc atc aat ggc ttg agt ccg gaa gag atc cgg gcc 1468
 Ala Met Arg Arg Arg Ile Asn Gly Leu Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 430 435 440

ctg tcc aag gag gag ctg cag atg cct gtc acc aga ggg gac ttg gag 1516
 Leu Ser Lys Glu Glu Leu Gln Met Pro Val Thr Arg Gly Asp Leu Glu
 445 450 455 460

ttg gct ctg aag aaa atc gcc aag tct gtc tca gcg gca gac ctg gag 1564
 Leu Ala Leu Lys Lys Ile Ala Lys Ser Val Ser Ala Ala Asp Leu Glu
 465 470 475

aag tac gaa aag tgg atg gtt gag ttt ggg tct gca tga ttggtcagct 1613
 Lys Tyr Glu Lys Trp Met Val Glu Phe Gly Ser Ala
 480 485

cttccatctc tgggagtttt ctttatgaaa tgtgaagaaa ttccctgaaat taaaaaaaaa 1673

aatctggaag ttttaatcag aggaatcttc acttgaaggc caaaccacaaa cagaaatgcc 1733

agaggtacag agaaatgtag ttgagaaaca aggtatgatc atacagtctg ctggctccag 1793

gctaccaaac ctcatacttg tgtacagaat aagagagcca gtggcccggg ctgaaggggt 1853

agctctgtgc agggagggcc ttgtttacaa agcattggca gagttttctt gcccatcagt 1913

gcactgactg gtagtttgga attgtcactt tgagtggaaat gatcacaagt tcttcaggaa 1973

taatttttaa atctctagaa totaatactt cctgttagag ttgaaaatgt agttagtact 2033

cactcctctt agcttaccag ttccctctgtt agctgccgcc ttacatccac cagggaagag 2093

tctctgaccg actgctccgt tgacatttgc cctggcctgt agtctctgtg ccggggcctc 2153

tcctgcttcc tttgcaatga tgggaagagc ccttcttagt tagcagcagc cttcagcctt 2213

tgaagtcttc actcttcctt cagtactctc aagtcaatat ggctactgtt tttctcacc 2273

tccaacactg tgtgcttttg tagaatttaa cctgtttagg tcggtaatct gagttccaaa 2333

caagactagt ctctaggcg aatgcaaaag aacctttccc ctcttctgca tgtgagcgag 2393

cattctgcc aacgcagatgt ctgtatacca catgcatgca gtgcccaggagg aggccagaga 2453

ggacattggg tcccctgggt ctggaattac aggggtgtgtg agccaccgtg tggatgctgg 2513

gaaccaaacc caggtctcta caagggcagc cagtgttctt aacggctgag ccatccctcc 2573

aaccccacaa acagaacctt tgaacttgtg catgcagtgg gactagagca gacagctgcc 2633

atgctcggtta gatgcggagt aaccaggaag gaggatctca gacagggggc gcatgagtgt 2693

ggtcacacgc actgtgccct gatgtccgtt ctctgtgatt aattacacct gcccttctgg 2753

atcaccaggc aacctatgct tcaaaagttt gtctaataat atcctgattc tcgagcctat 2813

ttttaagctat atactatata caccttagag gcacttttaa aaactcctag tatgttgctt 2873

aagatatattg accccttttt ctactaaaa cctataaatg catcacgctc ttttcaggag 2933

acataagccc gactctctaa actcttggtt tcactctgatt actgtaaatt tcccccttct 2993

ttctgagagg	gagtgaaggg	ccccagcagg	ctgaccattg	cacacacagc	ggagcatagc	3053
agacatggca	ctgacaggtt	ttgtcgttta	cccctctccc	ccactgagct	gttagcttga	3113
tcctgaagct	cactaccaag	gtctggcccc	ttattcagtc	actgactcat	tcctgagacc	3173
gagcaccaag	gtctagctat	cagaattcag	tatttcgact	aacctaaacta	acataaccaa	3233
ccagatctta	ccagcacgtt	ctcgctcact	ctaagacaga	gtcccccctt	tcctcttacg	3293
attaacacct	gcaaagctat	ttactgttgt	ttctgtgtaa	ttcagactca	gccaccttgt	3353
ctcatctctc	tgcocttgctt	aataaaggat	ctctttgcat	ttggcttggtg	cttggacgga	3413
gggtgtttgga	tgtggtctgt	gcctaaccgg	gggtccagag	gggagcatcc	cacagtgcac	3473
aggtcccttc	gtaaggatta	taaaatttca	aatcaaaaga	catttgtaat	gggactaatt	3533
ttaaaattag	actgagagac	tcttccttcc	atgaacaaac	ttgcttttat	ttatttactt	3593
tgaggaagag	tctgactctg	ttgccaatgc	tggctctcag	ctgtttcagc	ctcccagtag	3653
ctgggactga	ttattgataa	atgcttaaaa	taaacaacta	atgtggaagg	ctgatgcagg	3713
aggatccata	ggaaacagaa	acagcccaaa	tgccccccag	ctgctgaaag	tatgatgaaa	3773
atatcacaca	cacacacaca	cacacacaca	cacacacaca	cacgaagagt	ctgaagccag	3833
cttgtgtaga	ctagcaaggc	cctatctcaa	aatcaaaaca	gaaagaacco	cattcaatcc	3893
tcttggttga	tttcaaaaag	aaggaaggaa	ggaaggaagg	aaggaaggaa	ggaaggaagg	3953
aaggaaggaa	ggaaggaaaa	gaaaaaagaa	aagaaaagaa	aagaaagaag	aaagagaagg	4013
aaggaagacc	gaccttctct	ataaccctgc	tggttggcag	acctttctctg	gctctggcat	4073
tagttacctt	tgcataaaac	catttttttt	ctggagtcc	catgcaccca	cagtacaggc	4133
ctgcgtctac	gctagggtag	gtggtggtct	gtagttagta	agtcacatgt	gcgctccctc	4193
catccctccc	tcctcacaag	ctgtcagtag	acggcacaga	tctgtaagag	gccggccact	4253
cagatgtctc	tctcctgtaa	gacatgctgt	ccacacattg	tcactgccat	ggcggcagga	4313
agcatgttac	tctgcacaca	gtaggaaaca	ggagctctgg	ggcagcagca	caggggctgg	4373
tgtgtgcaca	gttgtttcat	cgtcccatca	tgggcacacc	gtgctggtca	ccctcgctgt	4433
gtagatggtg	ggtggaggct	acgtgacttg	ccaagtagtg	ctggaccctg	aagctgtggc	4493
tggacatttt	ctccagtaac	tgccctctct	ggctcctgct	actaaagcac	gagtttagtt	4553
tataactgga	gagacagcga	tctgtgtgtt	tggagaagag	aataacaga	aaggttttcc	4613
cctttgcttt	tcttttgaaa	cctttgattg	gttttaaatt	gtttaaaatg	agttttaaac	4673
aattaaacag	tttgcctaaa	caatcaaaca	attgtttgtt	taaacacacc	attaaaaatc	4733
aatcgatgaa	agatctattt	cagtgcaccc	actttatcat	ttttgtgcca	cgattatacg	4793
tgtgattatg	caaagcatac	acgcaagtaa	tgcgattact	gtgaaagctt	ccatagtttc	4853
ctttttaaag	aaagtaagat	aatattggtg	agatgtccca	gacaaatgga	agctgtggcc	4913

```

tcctagttac gcaggttagg aacaggtgac atcacaggcc ttccacccat gagttccatc 4973
cttcagtaga gtgaccccag gcaacacatg gocatcagaa atgccagact gggacatcct 5033
gccggggcct tcacaggaga gcctgggtca cagttcagtc acacagctgt ctaactttca 5093
gggagttcac caagtggggt ggagtaggga aaccagcacc cacaagcagt caagcaggca 5153
cacggaggcc taaaacaagc agccgcccag gagtatgtgt gagccagtt tacagtatta 5213
attgtcgctg gttatccctg tgtgtattgt gactctgtgg ggagtcattg cctccttagc 5273
tcttgggtat ctgagttcat gaggttcct tocttagata cactacagga tcaggcagga 5333
gtctgccag gtaacctcct ccttgccotca cttgagaggc aggcaaagaa ctgggcctgt 5393
catttgcata gtggtcttgg ctctggcctc cttagtgagg tcttttttgg tctcttcata 5453
cacacacaca cacacacgca cacaggcccc caataataat aatagtacat ttctactgtt 5513
ttcttattaa atatagatca caactagggt atgactcatg ctttgggata aaatgttagg 5573
tgggagtcga ccttttctaa gaaaagatct aactgtggcg aactggaaga atctggacta 5633
ttccagcttt ctagtgtcct tgttttggtg cttaatgttt gcatgtacaa tgttttaaata 5693
ttgtgacaca tatgatactt atgtcaatot aagagtccac cacaacagaa gaaaatagga 5753
ccaagttgaa ggatgcattg ggggcaaatt aacctcacc gggaccgcac tgatattaaa 5813
gttgaaggat gggggggcggg ggaggggact aatcctcatg gggaccactc atccacaccg 5873
attatttctg cagtttattt acctcataat tattacatgt ttacttattt atgtgtttaa 5933
tttaggcttt ccttatttat ttaatttttg ggtcacttgc ttttgatatt atttcttaat 5993
gtggaaactg agtattttaa atattagatc tgtatggtga tatgttttta cacatttact 6053
tagtagtaat ttgaattttt accagtttat ttttttttga aaaatgtagt tttgatgata 6113
attctcattt caggtgcctt attaataaaa gottattaag aggaaaaaaa aaaaaaaaaa 6173

```

<210> 6

<211> 488

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

```

Met Asn Leu Ala Glu Ile Cys Glu Asn Ala Lys Lys Gly Arg Glu Tyr
1           5           10           15

```

```

Ala Leu Leu Gly Asn Tyr Asp Ser Ser Met Val Tyr Tyr Gln Gly Val
20           25           30

```

```

Ile Gln Gln Ile Gln Arg His Cys Gln Ser Leu Arg Asp Pro Ala Thr
35           40           45

```

5

10

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

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

<210> 7
 <211> 1559
 <212> ADN
 <213> *Bos taurus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1473)
 <223>

<400> 7

ES 2 595 161 T3

atg	aat	ttg	gct	gag	att	tgt	gac	aat	gca	aag	aaa	gga	aga	gaa	tat	48
Met	Asn	Leu	Ala	Glu	Ile	Cys	Asp	Asn	Ala	Lys	Lys	Gly	Arg	Glu	Tyr	
1				5					10					15		

gca ctt ctt gga aat tat gac tca tcc atg gta tat tac cag ggg gtg	96
Ala Leu Leu Gly Asn Tyr Asp Ser Ser Met Val Tyr Tyr Gln Gly Val	
20 25 30	
atc cag cag att cag aga cat tgc cag tca gtc aga gac cca gcg gtc	144
Ile Gln Gln Ile Gln Arg His Cys Gln Ser Val Arg Asp Pro Ala Val	
35 40 45	
aaa ggc aga tgg cag cag gtt cgg cag gaa tta ttg gaa gaa tat gaa	192
Lys Gly Arg Trp Gln Gln Val Arg Gln Glu Leu Leu Glu Glu Tyr Glu	
50 55 60	
caa gtt aaa agt att gtc agt act ttg gaa agt ttt aaa atc gac agg	240
Gln Val Lys Ser Ile Val Ser Thr Leu Glu Ser Phe Lys Ile Asp Arg	
65 70 75 80	
ccc cca gat ttc cct gtg tcc tgt caa gat gaa ccg ttt aga gat cct	288
Pro Pro Asp Phe Pro Val Ser Cys Gln Asp Glu Pro Phe Arg Asp Pro	
85 90 95	
gcc gtg tgg ccg ccc ccc gta cct gca gaa cac aaa gct cca cct cag	336
Ala Val Trp Pro Pro Pro Val Pro Ala Glu His Lys Ala Pro Pro Gln	
100 105 110	
ata agg cgt ccc aat cga gaa gta aga cct ctg agg aaa gag atg cca	384
Ile Arg Arg Pro Asn Arg Glu Val Arg Pro Leu Arg Lys Glu Met Pro	
115 120 125	
gga ggc ggc gcc cgg gga cct gta ggc cga gca cat ccc ata tct aag	432
Gly Gly Gly Ala Arg Gly Pro Val Gly Arg Ala His Pro Ile Ser Lys	
130 135 140	
agc gag aag ccc tcc acc agc agg gac aag gac tgc aga gcc aga ggg	480
Ser Glu Lys Pro Ser Thr Ser Arg Asp Lys Asp Cys Arg Ala Arg Gly	
145 150 155 160	
aga gat gac aag gga agg aaa aat atg caa gat ggt aca agt gat ggt	528
Arg Asp Asp Lys Gly Arg Lys Asn Met Gln Asp Gly Thr Ser Asp Gly	
165 170 175	
gaa att cca aaa ttt gat ggt gct gca tat gat aag gac ctg gtg gaa	576
Glu Ile Pro Lys Phe Asp Gly Ala Ala Tyr Asp Lys Asp Leu Val Glu	
180 185 190	
gcc ctt gag aga gac atc gtc tcc agg aac cca agt gtt cac tgg gat	624
Ala Leu Glu Arg Asp Ile Val Ser Arg Asn Pro Ser Val His Trp Asp	
195 200 205	
gac ata gca gat ctg gaa gaa gct aag aag ttg ctg aga gaa gct gtc	672
Asp Ile Ala Asp Leu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Leu Arg Glu Ala Val	
210 215 220	
gtc ctt ccc atg tgg atg cct gac ttt ttc aaa ggg att aga agg cca	720
Val Leu Pro Met Trp Met Pro Asp Phe Phe Lys Gly Ile Arg Arg Pro	
225 230 235 240	
tgg aag gga gtg ctg atg gtt ggg ccc cca ggc act gga aag acc atg	768
Trp Lys Gly Val Leu Met Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Met	
245 250 255	
ctg gct aaa gcc gtg gcc acc gag tgc ggc aca acc ttc ttt aat gtc	816
Leu Ala Lys Ala Val Ala Thr Glu Cys Gly Thr Thr Phe Phe Asn Val	

	260		265		270	
tcc tct tcc aca ctg acg tct aaa tat aga ggc gaa tct gag aag ttg						864
Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ser Lys Tyr Arg Gly Glu Ser Glu Lys Leu						
	275		280		285	
gtt cgt ctg ttg ttt gaa atg gct agg ttt tat gcc ccc acc acg atc						912
Val Arg Leu Leu Phe Glu Met Ala Arg Phe Tyr Ala Pro Thr Thr Ile						
	290		295		300	
ttc atc gat gag ata gat tct atc tgc agt cga aga gga acc tct gat						960
Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Arg Arg Gly Thr Ser Asp						
	305		310		315	320
gaa cat gag gca agt cgc aga gtc aag tct gag ctg ctc att cag atg						1008
Glu His Glu Ala Ser Arg Arg Val Lys Ser Glu Leu Leu Ile Gln Met						
	325		330		335	
gat gga gta gga gga gct ttg gag aat gat gat cct tcc aaa atg gtc						1056
Asp Gly Val Gly Gly Ala Leu Glu Asn Asp Asp Pro Ser Lys Met Val						
	340		345		350	
atg gta ttg gct gcc act aac ttc cca tgg gac att gat gaa gca ttg						1104
Met Val Leu Ala Ala Thr Asn Phe Pro Trp Asp Ile Asp Glu Ala Leu						
	355		360		365	
cgg agg aga tta gaa aaa agg ata tat ata cct ctg ccg aca gca aaa						1152
Arg Arg Arg Leu Glu Lys Arg Ile Tyr Ile Pro Leu Pro Thr Ala Lys						
	370		375		380	
gga aga act gag ctt ctg aaa atc aat ctt cgt gag gtt gag ctg gat						1200
Gly Arg Thr Glu Leu Leu Lys Ile Asn Leu Arg Glu Val Glu Leu Asp						
	385		390		395	400
cca gat att caa ctg gaa gat ata gca gag aag att gag ggg tac tct						1248
Pro Asp Ile Gln Leu Glu Asp Ile Ala Glu Lys Ile Glu Gly Tyr Ser						
	405		410		415	
ggt gct gat ata act aac gtt tgc agg gat gca tcc tta atg gcc atg						1296
Gly Ala Asp Ile Thr Asn Val Cys Arg Asp Ala Ser Leu Met Ala Met						
	420		425		430	
aga cgg cga atc aac ggt ctc agt cca gaa gag atc cgt gca ctc tct						1344
Arg Arg Arg Ile Asn Gly Leu Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Leu Ser						
	435		440		445	
aaa gag gag ctt cag atg ccc gtg acc aga gga gac ttt gag ttg gct						1392
Lys Glu Glu Leu Gln Met Pro Val Thr Arg Gly Asp Phe Glu Leu Ala						
	450		455		460	
ctt aag aaa atc gca aag tct gtc tct gca gca gac tta gag aaa tat						1440
Leu Lys Lys Ile Ala Lys Ser Val Ser Ala Ala Asp Leu Glu Lys Tyr						
	465		470		475	480
gaa aag tgg atg gta gaa ttt gga tct gct tga atttctgtca gctctttcat						1493
Glu Lys Trp Met Val Glu Phe Gly Ser Ala						
	485		490			
ttctgggtatt ttgtctata aaatgtgaag aaattccagc aatttttttt tttaaaacag						1553
gtttga						1559

<210> 8
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 8

```

Met Asn Leu Ala Glu Ile Cys Asp Asn Ala Lys Lys Gly Arg Glu Tyr
1          5          10          15

Ala Leu Leu Gly Asn Tyr Asp Ser Ser Met Val Tyr Tyr Gln Gly Val
20          25          30

Ile Gln Gln Ile Gln Arg His Cys Gln Ser Val Arg Asp Pro Ala Val
35          40          45

Lys Gly Arg Trp Gln Gln Val Arg Gln Glu Leu Leu Glu Glu Tyr Glu
50          55          60

Gln Val Lys Ser Ile Val Ser Thr Leu Glu Ser Phe Lys Ile Asp Arg
65          70          75          80

Pro Pro Asp Phe Pro Val Ser Cys Gln Asp Glu Pro Phe Arg Asp Pro
85          90          95

Ala Val Trp Pro Pro Pro Val Pro Ala Glu His Lys Ala Pro Pro Gln
100         105         110

Ile Arg Arg Pro Asn Arg Glu Val Arg Pro Leu Arg Lys Glu Met Pro
115         120         125

Gly Gly Gly Ala Arg Gly Pro Val Gly Arg Ala His Pro Ile Ser Lys
130         135         140

Ser Glu Lys Pro Ser Thr Ser Arg Asp Lys Asp Cys Arg Ala Arg Gly
145         150         155         160

Arg Asp Asp Lys Gly Arg Lys Asn Met Gln Asp Gly Thr Ser Asp Gly
165         170         175

Glu Ile Pro Lys Phe Asp Gly Ala Ala Tyr Asp Lys Asp Leu Val Glu
180         185         190

Ala Leu Glu Arg Asp Ile Val Ser Arg Asn Pro Ser Val His Trp Asp
195         200         205

Asp Ile Ala Asp Leu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Leu Arg Glu Ala Val
210         215         220

```

Val	Leu	Pro	Met	Trp	Met	Pro	Asp	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Arg	Arg	Pro	225	230	235	240
Trp	Lys	Gly	Val	Leu	Met	Val	Gly	Pro	Pro	Gly	Thr	Gly	Lys	Thr	Met	245	250	255	
Leu	Ala	Lys	Ala	Val	Ala	Thr	Glu	Cys	Gly	Thr	Thr	Phe	Phe	Asn	Val	260	265	270	
Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg	Gly	Glu	Ser	Glu	Lys	Leu	275	280	285	
Val	Arg	Leu	Leu	Phe	Glu	Met	Ala	Arg	Phe	Tyr	Ala	Pro	Thr	Thr	Ile	290	295	300	
Phe	Ile	Asp	Glu	Ile	Asp	Ser	Ile	Cys	Ser	Arg	Arg	Gly	Thr	Ser	Asp	305	310	315	320
Glu	His	Glu	Ala	Ser	Arg	Arg	Val	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Ile	Gln	Met	325	330	335	
Asp	Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Asp	Asp	Pro	Ser	Lys	Met	Val	340	345	350	
Met	Val	Leu	Ala	Ala	Thr	Asn	Phe	Pro	Trp	Asp	Ile	Asp	Glu	Ala	Leu	355	360	365	
Arg	Arg	Arg	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Tyr	Ile	Pro	Leu	Pro	Thr	Ala	Lys	370	375	380	
Gly	Arg	Thr	Glu	Leu	Leu	Lys	Ile	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Glu	Leu	Asp	385	390	395	400
Pro	Asp	Ile	Gln	Leu	Glu	Asp	Ile	Ala	Glu	Lys	Ile	Glu	Gly	Tyr	Ser	405	410	415	
Gly	Ala	Asp	Ile	Thr	Asn	Val	Cys	Arg	Asp	Ala	Ser	Leu	Met	Ala	Met	420	425	430	
Arg	Arg	Arg	Ile	Asn	Gly	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala	Leu	Ser	435	440	445	
Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Met	Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Asp	Phe	Glu	Leu	Ala	450	455	460	
Leu	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Asp	Leu	Glu	Lys	Tyr	465	470	475	480

Glu Lys Trp Met Val Glu Phe Gly Ser Ala
485 490

<210> 9
<211> 2274
<212> ADN
<213> *Equus caballus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2013)
<223>

<400> 9

atg ggc gcg gag gag ggc tgg acc aga cgc tct tca ccg agc cgg gcg	48
Met Gly Ala Glu Glu Gly Trp Thr Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Ala	
1 5 10 15	
cgg aga cgc cct gct gtt cct tcc tct gac cag cat ctc gag aca gcg	96
Arg Arg Arg Pro Ala Val Pro Ser Ser Asp Gln His Leu Glu Thr Ala	
20 25 30	
cag cgc ggg cag cag cgc gct ccg cga gac aga cac gcg tcc tgc cac	144
Gln Arg Gly Gln Gln Arg Ala Pro Arg Asp Arg His Ala Ser Cys His	
35 40 45	
ggg gac gag gcg ctg ccg cgg cag gca gaa cca gcg ctc aat cat tac	192
Gly Asp Glu Ala Leu Pro Arg Gln Ala Glu Pro Ala Leu Asn His Tyr	
50 55 60	
acc ctg tcc ccg gcc gcg gga gac agg cgg cgt ttt cac aaa gag att	240
Thr Leu Ser Pro Ala Ala Gly Asp Arg Arg Arg Phe His Lys Glu Ile	
65 70 75 80	
ctc cgg cgc ggg ccg cgg tgc ggg agg ggg aga gca gag gac gcg cga	288
Leu Arg Arg Gly Pro Arg Cys Gly Arg Gly Arg Ala Glu Asp Ala Arg	
85 90 95	
gcc tcg gcg ggc att atg ggg att gta gtt cag cgg ctc cct cgg cct	336
Ala Ser Ala Gly Ile Met Gly Ile Val Val Gln Arg Leu Pro Arg Pro	
100 105 110	
cgc gcc ctt ggc ggg gtg cct gga cgg gcg aac tac aaa gcc cgg cgc	384
Arg Ala Leu Gly Gly Val Pro Gly Arg Ala Asn Tyr Lys Ala Arg Arg	
115 120 125	
ccc gac agc tgg gaa aga ccg ata act ttg agc cga cca gga gaa gag	432
Pro Asp Ser Trp Glu Arg Pro Ile Thr Leu Ser Arg Pro Gly Glu Glu	
130 135 140	
aaa tct ctc ttt gtg gtg agg ggc ctc atg ggt ggt cgc gat ttg ggc	480
Lys Ser Leu Phe Val Val Arg Gly Leu Met Gly Gly Arg Asp Leu Gly	
145 150 155 160	
tct gtg cgc tgg gaa ggg gaa gtg gag ttg aga cgt gtg ctt ccc gcc	528
Ser Val Arg Trp Glu Gly Glu Val Glu Leu Arg Arg Val Leu Pro Ala	
165 170 175	
ctg cca ttt ggc cgg ccg ggc tac agc gct cag ccc cac ccc ggc tgg	576
Leu Pro Phe Gly Arg Pro Gly Tyr Ser Ala Gln Pro His Pro Gly Trp	
180 185 190	

gcc gcc gcc cgc cta gtc tca ggg atg agc agc cgc cca ggc tgc agg Ala Ala Ala Arg Leu Val Ser Gly Met Ser Ser Arg Pro Gly Cys Arg 195 200 205	624
gcc tcg ggc ctt cgg cgc ctc tca ccc tcc cag gtt gct gcc gct cgg Ala Ser Gly Leu Arg Arg Leu Ser Pro Ser Gln Val Ala Ala Ala Arg 210 215 220	672
tgc aga acc cat aaa ggt tat ttt ttt aag gtt cgg cag gaa tta ttg Cys Arg Thr His Lys Gly Tyr Phe Phe Lys Val Arg Gln Glu Leu Leu 225 230 235 240	720
gaa gaa tat gaa caa gtt aaa agt att gtc agc act ttg gag agt ttt Glu Glu Tyr Glu Gln Val Lys Ser Ile Val Ser Thr Leu Glu Ser Phe 245 250 255	768
aaa att gac aag ccc cca gat ttc cct gtg tct tct caa gat gaa ccg Lys Ile Asp Lys Pro Pro Asp Phe Pro Val Ser Ser Gln Asp Glu Pro 260 265 270	816
ttt aga gat ccc gct gtt tgg ccg ccc cct gta cct gca gaa cac aga Phe Arg Asp Pro Ala Val Trp Pro Pro Pro Val Pro Ala Glu His Arg 275 280 285	864
gct ccg cct cag ata agg cgc ccc aat cga gaa gta aga cct ctg aga Ala Pro Pro Gln Ile Arg Arg Pro Asn Arg Glu Val Arg Pro Leu Arg 290 295 300	912
aaa gaa atg cca gga gta gga gcc cgg gga cct gtc ggc cga gcg cat Lys Glu Met Pro Gly Val Gly Ala Arg Gly Pro Val Gly Arg Ala His 305 310 315 320	960
cct ata tca aag agt gaa aaa ccc tcc aca agt agg gac aag gat tac Pro Ile Ser Lys Ser Glu Lys Pro Ser Thr Ser Arg Asp Lys Asp Tyr 325 330 335	1008
aga gcc aaa ggg aga gat gac aag gga agg aaa cat atg caa gat ggt Arg Ala Lys Gly Arg Asp Asp Lys Gly Arg Lys His Met Gln Asp Gly 340 345 350	1056
gca agt gat ggt gaa att cca aaa ttt gat ggt gct gga tat gat aag Ala Ser Asp Gly Glu Ile Pro Lys Phe Asp Gly Ala Gly Tyr Asp Lys 355 360 365	1104
gac ttg gtg gag gcc ctc gag aga gac atc gtg tcc agg aat cct agc Asp Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Asp Ile Val Ser Arg Asn Pro Ser 370 375 380	1152
att cat tgg gat gac ata gcg gat ctg gaa gaa gct aag aag ttg ctg Ile His Trp Asp Asp Ile Ala Asp Leu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Leu 385 390 395 400	1200
agg gaa gct gtt gtt ctt ccg atg tgg atg cct gac ttc ttc aaa ggg Arg Glu Ala Val Leu Pro Met Trp Met Pro Asp Phe Phe Lys Gly 405 410 415	1248
att aga agg cca tgg aag ggt gtg ctg atg gtt gga ccc cca ggc act Ile Arg Arg Pro Trp Lys Gly Val Leu Met Val Gly Pro Pro Gly Thr 420 425 430	1296
ggt aag act atg cta gct aaa gct gtc gcc acg gaa tgt ggc aca acg Gly Lys Thr Met Leu Ala Lys Ala Val Ala Thr Glu Cys Gly Thr Thr 435 440 445	1344

435	440	445	
ttc ttc aac gtt tcc tct tct aca ctg acg tct aaa tat aga ggt gaa Phe Phe Asn Val Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ser Lys Tyr Arg Gly Glu 450 455 460			1392
tct gag aag tta gtc cgt ctg ttg ttt gaa atg gct aga ttt tat gcc Ser Glu Lys Leu Val Arg Leu Leu Phe Glu Met Ala Arg Phe Tyr Ala 465 470 475 480			1440
ccc acc aca atc ttc att gat gag ata gat tct atc tgc agt cga aga Pro Thr Thr Ile Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Arg Arg 485 490 495			1488
gga acc tct gat gaa cat gag gcc agt cgc aga gtc aag tct gaa cta Gly Thr Ser Asp Glu His Glu Ala Ser Arg Arg Val Lys Ser Glu Leu 500 505 510			1536
ctc att cag atg gat gga gtt gga gga gct tta gag aat gac gat cct Leu Ile Gln Met Asp Gly Val Gly Gly Ala Leu Glu Asn Asp Asp Pro 515 520 525			1584
tcc aaa atg gtt atg gtg ttg gct gct act aat ttc cca tgg gac att Ser Lys Met Val Met Val Leu Ala Ala Thr Asn Phe Pro Trp Asp Ile 530 535 540			1632
gat gaa gct ttg cga agg aga tta gaa aaa agg ata tat ata cca ctc Asp Glu Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Lys Arg Ile Tyr Ile Pro Leu 545 550 555 560			1680
cca aca gca aaa gga aga act gag ctt ctg aag atc aat ctt cgt gag Pro Thr Ala Lys Gly Arg Thr Glu Leu Leu Lys Ile Asn Leu Arg Glu 565 570 575			1728
gtt gaa gtg gac cct gat att caa ctg gaa gat ata gca gag aag att Val Glu Val Asp Pro Asp Ile Gln Leu Glu Asp Ile Ala Glu Lys Ile 580 585 590			1776
gag gcc tat tct ggt gct gat ata act aat gtt tgc agg gat gcc tct Glu Gly Tyr Ser Gly Ala Asp Ile Thr Asn Val Cys Arg Asp Ala Ser 595 600 605			1824
tta atg gca atg aga cgg cga atc aat gcc tta agt cca gaa gag atc Leu Met Ala Met Arg Arg Arg Ile Asn Gly Leu Ser Pro Glu Glu Ile 610 615 620			1872
cgt gcg ctt tct aaa gag gag ctt cag atg cct gtg acc aga gga gac Arg Ala Leu Ser Lys Glu Glu Leu Gln Met Pro Val Thr Arg Gly Asp 625 630 635 640			1920
ttc gaa ttg gct ctt aag aaa att gct aag tct gtc tct gcc gca gac Phe Glu Leu Ala Leu Lys Lys Ile Ala Lys Ser Val Ser Ala Ala Asp 645 650 655			1968
ttg gag aag tat gaa aaa tgg atg gtt gaa ttt gga tct gct tga Leu Glu Lys Tyr Glu Lys Trp Met Val Glu Phe Gly Ser Ala 660 665 670			2013
atttctgaca ggtctttcat ttctggtatt ttgtttata aaatgtgaag aattcctgca			2073
attaaaaaaa aaaaataggt ttggaacttt tcgttgagaga gattttcacg taaaggaaaa			2133
aaaaaacccc taaaaccaca aagaatataa atgtagttga gaaataagaa aagcttacgt			2193

ES 2 595 161 T3

agagagcctg atagtctccg tcccctgget ttgtgctggt attccacgtg ctcatgcatt 2253

ggtattgcac gccagacca g 2274

<210> 10

<211> 670

<212> PRT

<213> *Equus caballus*

<400> 10

5

ES 2 595 161 T3

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

Ala	Ser	Gly	Leu	Arg	Arg	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Val	Ala	Ala	Ala	Arg	210	215	220	
Cys	Arg	Thr	His	Lys	Gly	Tyr	Phe	Phe	Lys	Val	Arg	Gln	Glu	Leu	Leu	225	230	235	240
Glu	Glu	Tyr	Glu	Gln	Val	Lys	Ser	Ile	Val	Ser	Thr	Leu	Glu	Ser	Phe	245	250	255	
Lys	Ile	Asp	Lys	Pro	Pro	Asp	Phe	Pro	Val	Ser	Ser	Gln	Asp	Glu	Pro	260	265	270	
Phe	Arg	Asp	Pro	Ala	Val	Trp	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Ala	Glu	His	Arg	275	280	285	
Ala	Pro	Pro	Gln	Ile	Arg	Arg	Pro	Asn	Arg	Glu	Val	Arg	Pro	Leu	Arg	290	295	300	
Lys	Glu	Met	Pro	Gly	Val	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Val	Gly	Arg	Ala	His	305	310	315	320
Pro	Ile	Ser	Lys	Ser	Glu	Lys	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Asp	Lys	Asp	Tyr	325	330	335	
Arg	Ala	Lys	Gly	Arg	Asp	Asp	Lys	Gly	Arg	Lys	His	Met	Gln	Asp	Gly	340	345	350	
Ala	Ser	Asp	Gly	Glu	Ile	Pro	Lys	Phe	Asp	Gly	Ala	Gly	Tyr	Asp	Lys	355	360	365	
Asp	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Arg	Asn	Pro	Ser	370	375	380	
Ile	His	Trp	Asp	Asp	Ile	Ala	Asp	Leu	Glu	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Leu	385	390	395	400
Arg	Glu	Ala	Val	Val	Leu	Pro	Met	Trp	Met	Pro	Asp	Phe	Phe	Lys	Gly	405	410	415	
Ile	Arg	Arg	Pro	Trp	Lys	Gly	Val	Leu	Met	Val	Gly	Pro	Pro	Gly	Thr	420	425	430	
Gly	Lys	Thr	Met	Leu	Ala	Lys	Ala	Val	Ala	Thr	Glu	Cys	Gly	Thr	Thr	435	440	445	
Phe	Phe	Asn	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg	Gly	Glu				

450		455		460
Ser Glu Lys Leu Val	Arg Leu Leu Phe Glu Met	Ala Arg Phe Tyr Ala		
465	470	475		480
Pro Thr Thr Ile Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Arg Arg				
	485	490		495
Gly Thr Ser Asp Glu His Glu Ala Ser Arg Arg Val Lys Ser Glu Leu				
	500	505		510
Leu Ile Gln Met Asp Gly Val Gly Gly Ala Leu Glu Asn Asp Asp Pro				
	515	520		525
Ser Lys Met Val Met Val Leu Ala Ala Thr Asn Phe Pro Trp Asp Ile				
	530	535		540
Asp Glu Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Lys Arg Ile Tyr Ile Pro Leu				
	545	550		555
Pro Thr Ala Lys Gly Arg Thr Glu Leu Leu Lys Ile Asn Leu Arg Glu				
	565	570		575
Val Glu Val Asp Pro Asp Ile Gln Leu Glu Asp Ile Ala Glu Lys Ile				
	580	585		590
Glu Gly Tyr Ser Gly Ala Asp Ile Thr Asn Val Cys Arg Asp Ala Ser				
	595	600		605
Leu Met Ala Met Arg Arg Arg Ile Asn Gly Leu Ser Pro Glu Glu Ile				
	610	615		620
Arg Ala Leu Ser Lys Glu Glu Leu Gln Met Pro Val Thr Arg Gly Asp				
	625	630		635
Phe Glu Leu Ala Leu Lys Lys Ile Ala Lys Ser Val Ser Ala Ala Asp				
	645	650		655
Leu Glu Lys Tyr Glu Lys Trp Met Val Glu Phe Gly Ser Ala				
	660	665		670

<210> 11
 <211> 1784
 <212> ADN
 <213> *Gallus gallus*

<220>
 <221> CDS

5

10

<222> (106)..(1575)
<223>

<400> 11

cgccccccctt cctcgctctg cttgagcgca gaaggaccgc gtccccctcc ccgctccgcc	60
ggcgccgggga cacgcacccc gctcctccca ggtttctgag agaag atg aat ttg gca	117
	Met Asn Leu Ala
	1
gag atc tgc gac aat gcc aaa aag gga aga gac tat gca ctc att ggg	165
Glu Ile Cys Asp Asn Ala Lys Lys Gly Arg Asp Tyr Ala Leu Ile Gly	
5 10 15 20	
aat tat gac tct tct atg gtg tat tac cag ggt gtc atc cag caa atc	213
Asn Tyr Asp Ser Ser Met Val Tyr Tyr Gln Gly Val Ile Gln Gln Ile	
25 30 35	
cag aga cat tgc cag tcg atc aga gat cca gca att aag ggc aaa tgg	261
Gln Arg His Cys Gln Ser Ile Arg Asp Pro Ala Ile Lys Gly Lys Trp	
40 45 50	
caa cag gtt cgg caa gaa tta gtc gaa gaa tat gag caa gtt aag agc	309
Gln Gln Val Arg Gln Glu Leu Val Glu Glu Tyr Glu Gln Val Lys Ser	
55 60 65	
att gtc gac act tta gag agt ttt aaa atg gac aga cct gca gat atc	357
Ile Val Asp Thr Leu Glu Ser Phe Lys Met Asp Arg Pro Ala Asp Ile	
70 75 80	
cct gtg toc tat caa gat gag cct ttt aga gac cct gct gtt tgg cca	405
Pro Val Ser Tyr Gln Asp Glu Pro Phe Arg Asp Pro Ala Val Trp Pro	
85 90 95 100	
cct cca gtt cca gct gaa cac agg gcc cca cct cag ata aag cgt ccc	453
Pro Pro Val Pro Ala Glu His Arg Ala Pro Pro Gln Ile Lys Arg Pro	
105 110 115	
aac cga gga gca aag ccc ttg agg aag gaa tcc ccg ggc ctg cag ccc	501
Asn Arg Gly Ala Lys Pro Leu Arg Lys Glu Ser Pro Gly Leu Gln Pro	
120 125 130	
cgt ggg ccc gtg ggc aga gca cag cca gca gtg agg agc gac aaa cct	549
Arg Gly Pro Val Gly Arg Ala Gln Pro Ala Val Arg Ser Asp Lys Pro	
135 140 145	
gca ggc agc cgt gac agg gag ccg agg gcc aga ggg agg gat gac aag	597
Ala Gly Ser Arg Asp Arg Glu Pro Arg Ala Arg Gly Arg Asp Asp Lys	
150 155 160	
gga aag aaa ata ccc cag gaa ggt gtt gct gat gat gtt cta aga ttt	645
Gly Lys Lys Ile Pro Gln Glu Gly Val Ala Asp Asp Val Leu Arg Phe	
165 170 175 180	
gat gga gcg ggt tat gac aaa gac ttg gtc gaa gct ctt gaa agg gac	693
Asp Gly Ala Gly Tyr Asp Lys Asp Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Asp	
185 190 195	
att gtg tca agg aat cca agc att cac tgg gat gac ata gca gat ttg	741
Ile Val Ser Arg Asn Pro Ser Ile His Trp Asp Asp Ile Ala Asp Leu	
200 205 210	
gaa gaa gcc aag aaa tta tta aga gaa gct gtt gtt ctt cca atg tgg	789
Glu Glu Ala Lys Lys Leu Leu Arg Glu Ala Val Val Leu Pro Met Trp	

ES 2 595 161 T3

215	220	225	
atg cct gat ttt ttc aaa ggg atc aga agg cct tgg aag ggc gtg ctg Met Pro Asp Phe Phe Lys Gly Ile Arg Arg Pro Trp Lys Gly Val Leu 230 235 240			837
atg gtt ggt cca cct ggt act ggc aaa aca atg cta gca aaa gct gtt Met Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Met Leu Ala Lys Ala Val 245 250 255 260			885
gct aca gaa tgt gga aca acg ttc ttc aac gtg tct tcc tct acg ctg Ala Thr Glu Cys Gly Thr Phe Phe Asn Val Ser Ser Ser Thr Leu 265 270 275			933
aca tct aaa tac aga ggc gaa tct gaa aag ctt gtc cgc ctc ttg ttt Thr Ser Lys Tyr Arg Gly Glu Ser Glu Lys Leu Val Arg Leu Leu Phe 280 285 290			981
gaa atg gcg agg ttt tac gct cca gca aca atc ttc att gat gaa att Glu Met Ala Arg Phe Tyr Ala Pro Ala Thr Ile Phe Ile Asp Glu Ile 295 300 305			1029
gat tca atc tgc agc cgc aga ggc aca tcc gat gag cac gaa gcg agt Asp Ser Ile Cys Ser Arg Arg Gly Thr Ser Asp Glu His Glu Ala Ser 310 315 320			1077
cgc aga gtc aag tca gag ctg ctt gtg caa atg gat ggg gta ggt ggt Arg Arg Val Lys Ser Glu Leu Leu Val Gln Met Asp Gly Val Gly Gly 325 330 335 340			1125
gct ttg gag aat gat gac cct tcc aag atg gtt atg gta tta gct gct Ala Leu Glu Asn Asp Asp Pro Ser Lys Met Val Met Val Leu Ala Ala 345 350 355			1173
aca aac ttt cct tgg gat att gat gaa gct ctc cga cgg aga ctg gaa Thr Asn Phe Pro Trp Asp Ile Asp Glu Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu 360 365 370			1221
aaa agg att tat ata cct ttg ccc aca gca aaa ggc aga gca gaa cta Lys Arg Ile Tyr Ile Pro Leu Pro Thr Ala Lys Gly Arg Ala Glu Leu 375 380 385			1269
ctt aag att aat ctt cgg gaa gta gaa ctg gat cct gac atc agc ctt Leu Lys Ile Asn Leu Arg Glu Val Glu Leu Asp Pro Asp Ile Ser Leu 390 395 400			1317
gag gaa att gct gag aag att gaa ggc tat tct ggt gct gac atc act Glu Glu Ile Ala Glu Lys Ile Glu Gly Tyr Ser Gly Ala Asp Ile Thr 405 410 415 420			1365
aat gtc tgc agg gat gcc tct tta atg gca atg aga cgg cgt att aac Asn Val Cys Arg Asp Ala Ser Leu Met Ala Met Arg Arg Arg Ile Asn 425 430 435			1413
ggc tta act cca gaa gag att cgg gca ctt tct aaa gag gaa ctt cag Gly Leu Thr Pro Glu Glu Ile Arg Ala Leu Ser Lys Glu Glu Leu Gln 440 445 450			1461
atg cca gtt acc aag ggg gac ttt gag ttg gct ctg aag aaa atc tcc Met Pro Val Thr Lys Gly Asp Phe Glu Leu Ala Leu Lys Lys Ile Ser 455 460 465			1509
aaa tct gtt tct gct gca gac ctg gag aag tac gag aaa tgg atg gcg			1557

ES 2 595 161 T3

Lys Ser Val Ser Ala Ala Asp Leu Glu Lys Tyr Glu Lys Trp Met Ala
 470 475 480

gag ttt gga tct gct taa tctcaccgac agctttccat tgtaagagtt 1605

Glu Phe Gly Ser Ala
 485

ttatggctct tggtgttttc acttgcaatg tgagttagaa atcttttttaa aggtttaata 1665

aaaggtctgc cgttctccct gtcccacccc cacccttcc tggtgacaag atcttttaaa 1725

ctctatttgc ctttaaaggg actgaacata ataacaagct gaaacggtta aaataaaaa 1784

<210> 12

<211> 489

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 12

5

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

Val	Leu	Arg	Phe	Asp	Gly	Ala	Gly	Tyr	Asp	Lys	Asp	Leu	Val	Glu	Ala	180	185	190	
Leu	Glu	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Arg	Asn	Pro	Ser	Ile	His	Trp	Asp	Asp	195	200	205	
Ile	Ala	Asp	Leu	Glu	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Leu	Arg	Glu	Ala	Val	Val	210	215	220	
Leu	Pro	Met	Trp	Met	Pro	Asp	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Arg	Arg	Pro	Trp	225	230	235	240
Lys	Gly	Val	Leu	Met	Val	Gly	Pro	Pro	Gly	Thr	Gly	Lys	Thr	Met	Leu	245	250	255	
Ala	Lys	Ala	Val	Ala	Thr	Glu	Cys	Gly	Thr	Thr	Phe	Phe	Asn	Val	Ser	260	265	270	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg	Gly	Glu	Ser	Glu	Lys	Leu	Val	275	280	285	
Arg	Leu	Leu	Phe	Glu	Met	Ala	Arg	Phe	Tyr	Ala	Pro	Ala	Thr	Ile	Phe	290	295	300	
Ile	Asp	Glu	Ile	Asp	Ser	Ile	Cys	Ser	Arg	Arg	Gly	Thr	Ser	Asp	Glu	305	310	315	320
His	Glu	Ala	Ser	Arg	Arg	Val	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Val	Gln	Met	Asp	325	330	335	
Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Asp	Asp	Pro	Ser	Lys	Met	Val	Met	340	345	350	
Val	Leu	Ala	Ala	Thr	Asn	Phe	Pro	Trp	Asp	Ile	Asp	Glu	Ala	Leu	Arg	355	360	365	
Arg	Arg	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Tyr	Ile	Pro	Leu	Pro	Thr	Ala	Lys	Gly	370	375	380	
Arg	Ala	Glu	Leu	Leu	Lys	Ile	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Glu	Leu	Asp	Pro	385	390	395	400
Asp	Ile	Ser	Leu	Glu	Glu	Ile	Ala	Glu	Lys	Ile	Glu	Gly	Tyr	Ser	Gly	405	410	415	
Ala	Asp	Ile	Thr	Asn	Val	Cys	Arg	Asp	Ala	Ser	Leu	Met	Ala	Met	Arg				

ES 2 595 161 T3

420

425

430

Arg Arg Ile Asn Gly Leu Thr Pro Glu Glu Ile Arg Ala Leu Ser Lys
435 440 445

Glu Glu Leu Gln Met Pro Val Thr Lys Gly Asp Phe Glu Leu Ala Leu
450 455 460

Lys Lys Ile Ser Lys Ser Val Ser Ala Ala Asp Leu Glu Lys Tyr Glu
465 470 475 480

Lys Trp Met Ala Glu Phe Gly Ser Ala
485

5 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador de T3

<400> 13
aattaaccct cactaaaggg 20

15 <210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador de T7

<400> 14
taatacgact cactatagg 19

25 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador en sentido

<400> 15
gatgaacatg aggcaagtcg 20

35 <210> 16
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> cebador antisentido

45 <400> 16
ggtaacaggc atctgaagtt cc 22

<210> 17
<211> 20

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> cebador en sentido

 <400> 17
 gtttctccaa tgtggatgcc 20

 10 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> cebador antisentido

 <400> 18
 tcttcagaag ctcagctctt cc 22
 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador antisentido

 <400> 19
 30 aagatgggtgc aagtgacagc 20

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

 <220>
 <223> cebador antisentido

 40 <400> 20
 tcgatgaaga tcgtggtagg 20

 <210> 21
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de GAPDH
 50
 <400> 21
 gggctgcttt taactctg 18

 <210> 22
 55 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador de GAPDH

 <400> 22
 ccaggaaatg agcttgac 18

 65 <210> 23
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador de gapdh

 <400> 23
 cttcaccacc atggagaagg 20

 10 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador de gapdh

 <400> 24
 tgaagtcgca ggagacaacc 20
 20
 <210> 25
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador en sentido

 <400> 25
 30 atgaatttgg cggagatttg tgagaatgc 29

 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador antisentido

 40 <400> 26
 tcatgcagac ccaaactcaa cc 22

 <210> 27
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador en sentido
 50
 <400> 27
 cccgggaattc atgaatttgg ctgagatttg tgataatgc 39

 <210> 28
 55 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> cebador antisentido

 <400> 28
 ccgccgctcg agtcaagcag atccaaattc aaccatcc 38

 65 <210> 29
 <211> 491

ES 2 595 161 T3

<212> PRT

<213> *Megathura crenulata*

<400> 29

5

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

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 inmunoaductor para su uso en un método de tratamiento médico o veterinario, comprendiendo el agente inmunoaductor como principio(s) eficaz(es) al menos un polipéptido que tiene actividad inmunoaductora
 5 seleccionado de entre los polipéptidos (a) a (b) más adelante y/o un(os) vector(es) recombinante(s) que comprende(n) un(os) polinucleótido(s) que codifica(n) dicho al menos un polipéptido, siendo capaz(es) dicho(s) vector(es) recombinante(s) de expresar *in vivo* dicho(s) polipéptido(s):
 - (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 2, 8, 10 y 12;
 - 10 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de no menos del 85 % con el polipéptido (a).
2. El agente inmunoaductor para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido que tiene actividad inmunoaductora es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:4, 2, 8, 10 o 12.
- 15 3. El agente inmunoaductor para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el método comprende administrar a un paciente
 - (i) el polipéptido o el vector,
 - (ii) un linfocito T citotóxico que se une de forma selectiva a un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporado dentro de una molécula de MHC, y/o
 - 20 (iii) una célula presentadora de antígeno que presenta sobre su superficie un complejo que comprende al menos uno de dichos polipéptidos incorporado dentro de una molécula de MHC.
4. El agente inmunoaductor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es para usar en el tratamiento o la prevención de cáncer(es).
- 25 5. El agente inmunoaductor para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho(s) cáncer(es) es/son un(os) cáncer(es) que expresan KATNAL1.
- 30 6. El agente inmunoaductor para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en donde dicho(s) cáncer(es) es/son cáncer de mama, tumor cerebral, adenocarcinoma perianal, neuroblastoma, mastocitoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides y/o leucemia.
7. El agente inmunoaductor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un inmunopotenciador.
- 35 8. El agente inmunoaductor para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho inmunopotenciador es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en adyuvante incompleto de Freund, montanida, poli-I:C y derivados del mismo, oligonucleótidos de CpG, interleucina 12, interleucina 18, interferón α , interferón β , interferón ω , interferón γ y ligando Flt3.
- 40 9. Un método *in vitro* de preparar una célula presentadora de antígeno, comprendiendo el método poner en contacto la célula presentadora de antígeno con dicho al menos un polipéptido seleccionado de entre:
 - (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 2, 8, 10 y 12; y
 - 45 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de no menos del 85 % con el polipéptido (a).
10. Un método *in vitro* de preparar un linfocito T citotóxico, comprendiendo el método:
 - cocultivar una célula presentadora de antígeno preparada de acuerdo con el método de la reivindicación 9 con al menos un linfocito T y
 - 50 permitir que prolifere el al menos un linfocito T.
- 55 11. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 10, en el que se usa una proporción de célula presentadora de antígeno: linfocito T de 1:1 a 1:100, opcionalmente en el que el cocultivo se lleva a cabo en presencia de IL-2, IL-6, IL-7 y/o IL-12.

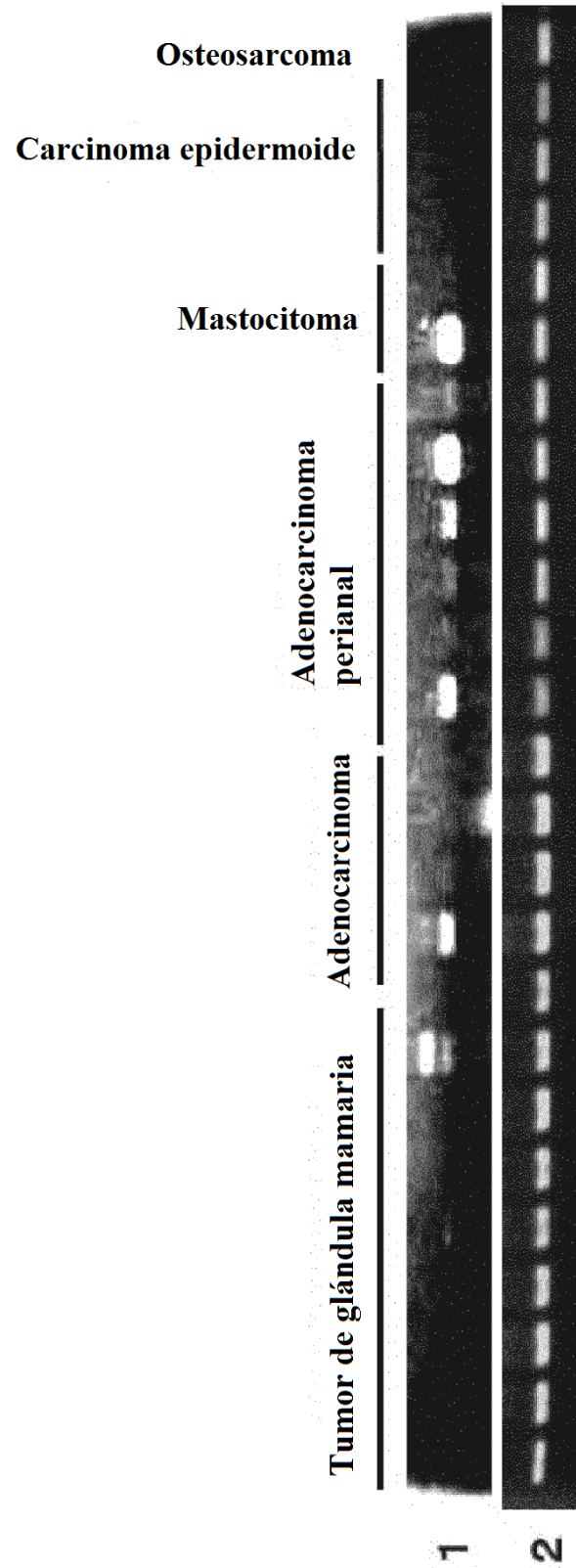


Fig.1

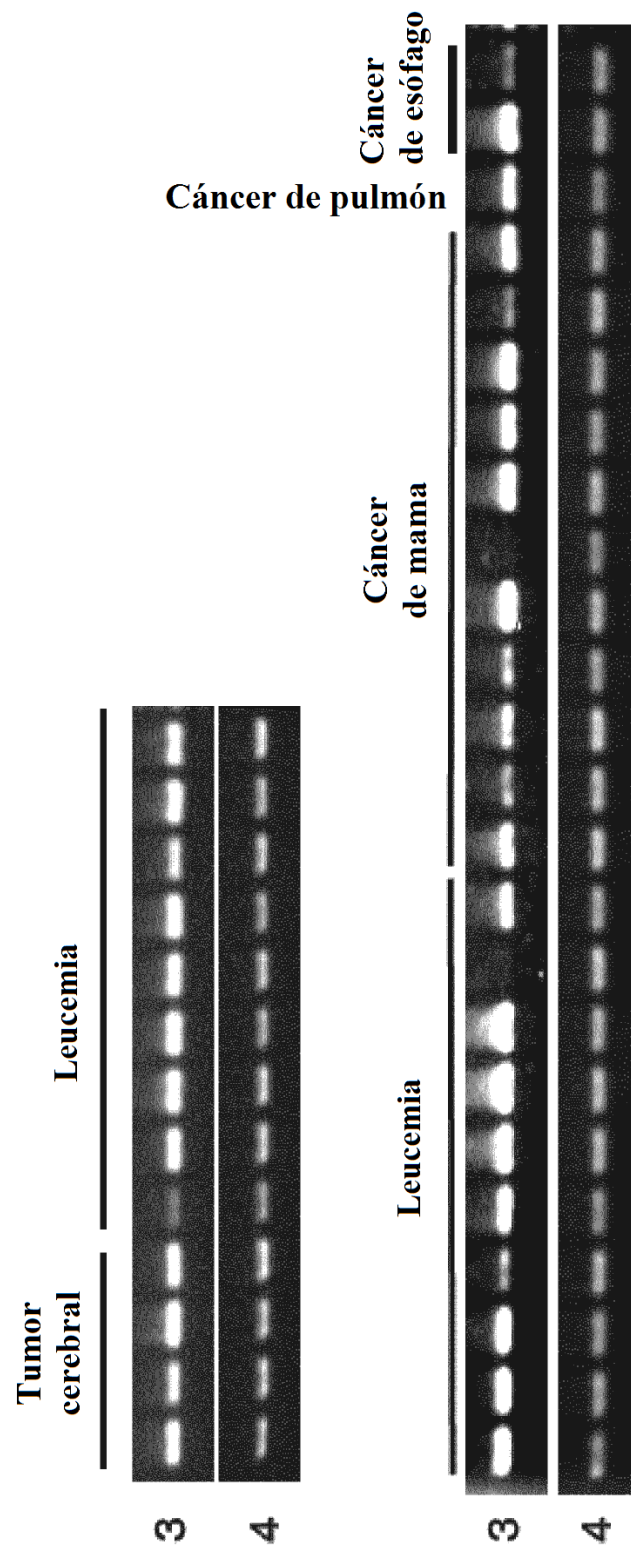


Fig.2

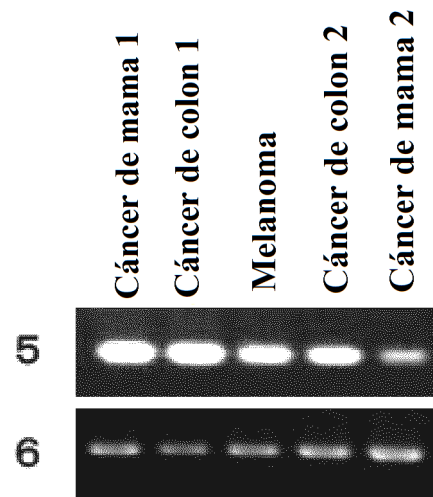


Fig.3