



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 670**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00910793 .9**

86 Fecha de presentación : **09.03.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1165778**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

54 Título: **Usos de polinucleótidos y polipéptidos CASB618.**

30 Prioridad: **11.03.1999 GB 9905607**
01.09.1999 GB 9920590

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **GlaxoSmithKline Biologicals S.A.**
rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es: **Bruck, Claudine Elvire Marie;**
Cassart, Jean-Pol;
Coche, Thierry y
Vinals y de Bassols, Carlota

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Usos de polinucleótidos y polipéptidos CASB618.

La presente invención se refiere a usos de polinucleótidos, denominados en este documento polinucleótidos CASB618, o a usos de polipéptidos codificados por ellos (denominados en este documento polipéptidos CASB618) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de colon y en procedimientos para diagnosticar el cáncer de colon. Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención son inmunógenos importantes para inmunización profiláctica o terapéutica específica frente a tumores, debido a que se expresan específicamente o se sobreexpresan altamente en tumores comparados con células normales y pueden fijarse como objetivo por mecanismos inmunes específicos de antígeno que conducen a la destrucción de la célula tumoral. Pueden usarse también para diagnosticar la existencia de células tumorales. Además, su expresión inapropiada en ciertas circunstancias puede provocar una inducción de respuestas inmunes inapropiadas, autoinmunes, que pueden corregirse por vacunación apropiada usando los mismos polipéptidos o polinucleótidos. En este aspecto, las propiedades biológicas más importantes son las actividades antigénicas e inmunogénicas de los polipéptidos descritos en este documento. Un polipéptido descrito en este documento puede mostrar también al menos otra actividad biológica de un polipéptido CASB618, lo que podría capacitarlo como una diana para intervención terapéutica o profiláctica diferente de la vinculada a su uso como un inmunoterapéutico.

La genómica funcional depende en gran medida de las tecnologías de secuenciación de ADN de alta producción y de las diversas herramientas de bioinformática para identificar secuencias de genes de interés potencial a partir de las muchas bases de datos de biología molecular disponibles actualmente. Pueden construirse bibliotecas de ADNc enriquecidas para genes de relevancia en un tejido particular o situación fisiológica usando estrategias de clonación sustractiva desarrolladas recientemente. Además, puede identificarse el ADNc encontrado en bibliotecas de ciertos tejidos y no otros usando procedimientos de detección electrónica apropiados.

La biología genómica de alta producción o basada en genes permite nuevos enfoques a la identificación y clonación de genes diana para respuestas inmunes útiles para la prevención y terapia de vacunas de enfermedades tales como cáncer y autoinmunidad.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a usos de polipéptidos CASB618. Tales péptidos incluyen polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene el menos el 70% de identidad, preferiblemente al menos el 80% de identidad, más preferiblemente al menos el 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos el 95% de identidad, lo más preferible al menos el 97-99% de identidad, con la de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2. Tales polipéptidos incluyen los que comprenden los aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

Los péptidos adicionales descritos en este documento incluyen polipéptidos aislados en los que la secuencia de aminoácidos tiene al menos el 70% de identidad, preferiblemente al menos el 80% de identidad, más preferiblemente al menos el 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos el 95% de identidad, lo más preferible al menos el 97-99% de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2. Tales polipéptidos incluyen el polipéptido de la SEC ID N°: 2.

Los polipéptidos adicionales descritos en este documento incluyen polipéptidos aislados codificados por un polinucleótido que comprende la secuencia contenida en la SEC ID N°: 1.

La invención proporciona también usos de un fragmento inmunogénico de un polipéptido CASB618, que es una porción contigua del polipéptido CASB618 que tiene las mismas o similares propiedades inmunogénicas que el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. Es decir, el fragmento (si es necesario, unido a un vehículo) es capaz de provocar una respuesta inmune que reconoce al polipéptido CASB618. Tal fragmento inmunogénico puede incluir, por ejemplo, el polipéptido CASB618 que carece de una secuencia líder N-terminal, un dominio transmembrana o un dominio de anclaje C-terminal. En un aspecto preferido, el fragmento inmunogénico de CASB618 de acuerdo con la invención comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido que tiene al menos el 70% de identidad, preferiblemente al menos el 80% de identidad, más preferiblemente al menos el 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos el 95% de identidad, lo más preferible al menos el 97-99% de identidad, con la de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2.

Los fragmentos peptídicos que incorporan un epítipo de CASB618 típicamente comprenderán al menos 7, preferiblemente 9 o 10 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2. Se muestran epítipes preferidos en la SEC ID N°: 5 a SEC ID N°: 77.

Los usos de péptidos que incorporan estos epítipes forman un aspecto preferido de la presente invención. Los mimotopos que tiene las mismas características que estos epítipes, e inmunógenos que comprende tales mimotopos que generan una respuesta inmune que reacciona de forma cruzada con un epítipo en el contexto de la molécula CASB618, forman también parte de la presente invención.

La presente invención, por lo tanto, incluye usos de péptidos aislados que abarcan estos epítipes por sí mismos, y cualquier mimotopo de los mismos. El significado de mimotopo se define como una entidad que es suficientemente

similar al epítipo de CASB618 nativo como para ser capaz de ser reconocido por anticuerpos que reconozcan la molécula nativa; (Gheysen, H.M., y col., 1986, Synthetic peptides as antigens. Wiley, Chichester, Ciba foundation symposium 119, p130-149; Gheysen, H.M., 1986, Molecular Immunology, 23,7,709-715); o es capaz de provocar anticuerpos, cuando se une a un vehículo adecuado, reaccionando los anticuerpos de forma cruzada con la molécula nativa.

Los mimotopos peptídicos de los epítopes identificados anteriormente pueden diseñarse para un propósito particular por adición, delección o sustitución de aminoácidos elegidos. De ese modo, los péptidos de la presente invención pueden estar modificados con los propósitos de facilitar la conjugación con un vehículo de proteína. Por ejemplo, puede ser deseable para algunos procedimientos de conjugación química incluir una cisteína terminal al epítipo. Además, puede ser deseable para péptidos conjugados con un vehículo de proteína incluir un extremo hidrófobo distal del extremo conjugado del péptido, de forma que el extremo no conjugado libre del péptido se mantenga asociado con la superficie de la proteína vehículo. Esto reduce los grados de libertad conformacional del péptido, y por lo tanto aumenta la probabilidad de que el péptido se presente en una conformación que se parezca mucho a la del péptido como se encuentra en el contexto de la molécula completa. Por ejemplo, pueden alterarse los péptidos para que tengan una cisteína N-terminal y una marca amidada hidrofóbica C-terminal. Como alternativa, puede realizarse la adición o sustitución de una forma de D-estereoisómero de uno o más de los aminoácidos para crear un derivado beneficioso, por ejemplo para potenciar la estabilidad del péptido. Los especialistas en la técnica se darán cuenta de que tales péptidos modificados, o mimotopos, podrían ser un mimotopo completa o parcialmente no peptídico en el que los restos constituyentes no se limitan necesariamente a los 20 aminoácidos que se encuentran de forma natural. Además, estos pueden ciclarse por técnicas conocidas en la técnica para forzar al péptido en una conformación que se parezca mucho a su forma cuando la secuencia peptídica está en el contexto de la molécula completa. Un procedimiento preferido para ciclar un péptido comprende la adición de un par de restos de cisteína para permitir la formación de un puente disulfuro.

Además, los especialistas en la técnica se darán cuenta de que los mimotopos o inmunógenos de la presente invención puede ser más grandes que los epítopes identificados anteriormente, y como tales pueden comprender las secuencias descritas en este documento. Por consiguiente, los mimotopos de la presente invención pueden estar constituidos por la adición de extensiones N y/o C terminales de varios otros restos naturales en uno o ambos extremos. Los mimotopos peptídicos pueden ser también secuencias retro de las secuencias naturales, en las que la orientación de la secuencia está invertida; o como alternativa, las secuencias pueden comprender completamente o al menos en parte aminoácidos D-estereoisómeros (secuencias inversas). También, las secuencias peptídicas pueden ser de carácter retro-inverso, en las que la orientación de la secuencia está invertida y los aminoácidos son de la forma D-estereoisómeros. Tales péptidos retro o retro-inversos tienen la ventaja de no ser propios, y como tales pueden superar problemas de auto-tolerancia en el sistema inmune.

Como alternativa, los mimotopos peptídicos pueden identificarse usando anticuerpos que sean capaces por sí mismos de unirse a los epítopes de la presente invención usando técnicas tales como la tecnología de presentación de fagos (documento EP 0 552 267 B1). Esta técnica genera un gran número de secuencias peptídicas que imitan la estructura de los péptidos nativos y son, por lo tanto, capaces de unirse a los anticuerpos del péptido anti-nativos, pero no necesariamente comparten por sí mismos homología de secuencia significativa con el péptido nativo. Este enfoque puede tener ventajas significativas permitiendo la posibilidad de identificar un péptido propiedades inmunogénicas potenciadas, o puede superar cualquier problema de tolerancia auto-antígeno-potencial que pueda estar asociado con el uso de la secuencia del péptido nativo. Adicionalmente, esta técnica permite la identificación de un patrón de reconocimiento para cada péptido nativo en términos de sus propiedades químicas compartidas entre secuencias del mimotopo reconocidas.

La unión covalente del péptido con el vehículo inmunogénico puede realizarse de una manera bien conocida en la técnica. De este modo, por ejemplo, para unión covalente directa, es posible utilizar una carbodiimida, glutaraldehído o éster de (N-[γ -maleimidobutiriloxi] succinimida, utilizando engarces heterobidifuncionales disponibles en el mercado comunes tales como CDAP y SPDP (usando las instrucciones del fabricante). Después de la reacción de unión, puede aislarse y purificarse fácilmente el inmunógeno por medio de un procedimiento de diálisis, un procedimiento de filtración en gel, un procedimiento de fraccionamiento, etc.

Los tipos de vehículos usados en los inmunógenos de la presente invención los conocerán fácilmente los especialistas en la técnica. La función del vehículo es proporcionar citoquinas ayudantes para ayudar a inducir una respuesta inmune frente al péptido. Una lista no exhaustiva de vehículos que pueden usarse en la presente invención incluye: Keyhole limpet Haemocyanin (hemocianina extraída del molusco "Lapa californiana") (KLH), seroalbúminas tales como seroalbúmina bovina (BSA), toxinas bacterianas inactivadas tales como toxinas del tétanos o de la difteria (TT y DT), o fragmentos recombinantes de las mismas (por ejemplo, Dominio 1 del Fragmento C de TT, o el dominio de translocación de DT), o la proteína purificada derivada de tuberculina (PPD). Como alternativa, los mimotopos o epítopes pueden conjugarse directamente con vehículos de liposoma, que pueden comprender adicionalmente inmunógenos capaces de proporcionar ayuda de células T. Preferiblemente, la proporción del mimotopo con el vehículo está en el orden de 1:1 a 20:1, y preferiblemente cada vehículo debe portar entre 3-15 péptidos.

En una realización de la invención un vehículo preferido es la Proteína D de *Haemophilus influenzae* (Documento EP 0 594 610 B1). La proteína D es una proteína de unión a IgD de *Haemophilus influenzae* y ha sido patentada por Gorgsgren (documento WO 91/18926, concedida por el documento EP 594 610 B1). En algunas circunstancias, por

ejemplo en sistemas de expresión de inmunógenos recombinantes, puede ser deseable usar fragmentos de la proteína D, por ejemplo, la Proteína D 1/3° (que comprende los aminoácidos 100-110 N-terminales de la Proteína D (documento GB 9717953.5)).

5 Otro procedimiento preferido de presentar los péptidos descritos en este documento es en el contexto de una molécula de fusión recombinante. Por ejemplo, el documento EP 0 421 635 B describe el uso de partículas del antígeno núcleo del hepadnavirus quiméricas para presentar secuencias peptídicas extrañas en una partícula similar a un virus. Como tales, los inmunógenos de la presente invención pueden comprender péptidos presentados en partículas quiméricas constituidas por el antígeno núcleo de la hepatitis C. Adicionalmente, las proteínas de fusión recombinantes
10 pueden comprender los mimotopos de la presente invención y una proteína vehículo, tal como NS1 del virus de la gripe. Para cualquier proteína expresada de forma recombinante que forme parte de la presente invención, el ácido nucleico que codifique dicho inmunógeno también forma un aspecto de la presente invención.

15 Los péptidos usados en la presente invención pueden sintetizarse fácilmente por procedimientos en fase sólida bien conocidos en la técnica. Pueden realizarse síntesis adecuadas utilizando los procedimientos "T-boc" o "F-moc". Pueden sintetizarse péptidos cíclicos por el procedimiento en fase sólida empleando el procedimiento "F-moc" bien conocido y una resina de poliamida en el aparato completamente automatizado. Como alternativa, los especialistas en la técnica conocerán los procedimientos de laboratorio necesarios para realizar el proceso de forma manual. Las técnicas y procedimientos para síntesis en fase sólida se describen en el documento "Solid Phase Peptide Synthesis:
20 A Practical Approach" de E. Atherton y R.C. Sheppard, publicado por IRL en Oxford University Press (1989). Como alternativa, pueden producirse los péptidos por procedimientos recombinantes, incluyendo expresión de moléculas de ácidos nucleicos que codifican los mimotopos en una línea celular bacteriana o de mamíferos, seguido por purificación del mimotopo expresado. Las técnicas de expresión recombinante de péptidos y proteínas se conocen en la técnica, y se describen en el documento de Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook y col., *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).
25

Los polipéptidos o fragmentos inmunogénicos descritos en este documento pueden estar en forma de proteína "madura" o pueden ser una parte de una proteína más grande tal como un precursor o una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias secretoras o líderes, pro-secuencias, secuencias que ayuden en la purificación tales como restos de histidina múltiples, o una secuencia adicional para estabilizar durante la producción recombinante. Además, se considera también la adición de polipéptidos exógenos o marcas de lípidos o secuencias polinucleotídicas para aumentar el potencial inmunogénico de la molécula final.
30

En un aspecto, la invención se refiere al uso de proteína de fusión solubles genéticamente modificadas que comprenden un polipéptido de la presente invención, o un fragmento del mismo, y diversas porciones de las regiones constantes de cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas de diversas subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Se prefiere como inmunoglobulina la parte constante de la cadena pesada de la IgG humana, particularmente IgG1, donde la fusión ocurre en la región de bisagra. En una realización particular, la parte Fc puede retirarse simplemente por incorporación de una secuencia de escisión que puede escindirse con el factor de coagulación sanguíneo Xa. Además, esta invención refiere a procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión por ingeniería genética, y al uso de las mismas para detección de fármacos, diagnóstico y terapia. Un aspecto adicional de la invención se refiere también a usos de los polinucleótidos que codifican tales proteínas de fusión. Pueden encontrarse ejemplos de tecnología de proteínas de fusión en las Solicitudes de Patente Internacional N° WO94/29458 y WO94/22914.
40

45 Las proteínas pueden conjugarse químicamente, o expresarse como proteínas de fusión recombinantes que permiten niveles aumentados de producción en un sistema de expresión comparados con proteínas no fusionadas. La pareja de fusión puede ayudar proporcionando epítopos ayudantes T (pareja de fusión inmunológica), preferiblemente epítopos ayudantes T reconocidos por seres humanos, o ayudar en la expresión de la proteína (potenciador de la expresión) a rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Preferiblemente, la pareja de fusión será tanto una pareja de fusión inmunológica como una pareja potenciadora de la expresión.
50

Las proteínas de fusión incluyen la proteína D de *Haemophilus influenza B* y la proteína no estructural del virus de la gripe, NS 1 (hemaglutinina). Otra pareja de fusión inmunológica es la proteína conocida como LYTA. Preferiblemente, se usa la porción C-terminal de la molécula. LYTA deriva de *Streptococcus pneumoniae* que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa, amidasa LYTA; (codificada por el gen *lytA* {Gene, 43 (1986) páginas 265-272} una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en la cadena principal del peptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad por la colina o por algunos análogos de la colina tales como DEAE. Se ha explotado esta propiedad para el desarrollo de plásmidos que expresen C-LYTA de *E. coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA y su extremo amino {Biotechnology: 10, (1992) páginas 795-798}. Es posible usar la porción repetida de la molécula de Lyta encontrada en el extremo C-terminal que comienza en el resto 178, por ejemplo los restos 188-305.
60

La presente invención incluye también el uso de variantes de los polipéptidos mencionados anteriormente, es decir, polipéptidos que varían de los referentes por sustitución de aminoácidos conservativa, por la cual se sustituye un resto por otro con características similares. Tales sustituciones típicas son entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los restos ácidos de Asp y Glu; entre Asn y Gln, y entre los restos básicos de Lys y Arg, o restos aromáticos de Phe y Tyr. Son variantes particularmente preferidas en las que varios aminoácidos, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 están sustituidos, delecionados o añadidos en cualquier combinación.
65

Los polipéptidos descritos en este documento pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Tales polipéptidos incluyen polipéptidos que se encuentran de forma natural aislados, polipéptidos producidos de manera recombinante, polipéptidos producidos de manera sintética, o polipéptidos producidos por una combinación de estos procedimientos. Los medios para preparar tales polipéptidos se entienden bien en la técnica.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a usos de polinucleótidos CASB618. Tales polinucleótidos incluyen polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos el 70% de identidad, preferiblemente al menos el 80% de identidad, más preferiblemente al menos el 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos el 95% de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2. En este aspecto, los polipéptidos que tienen al menos el 97% de identidad se prefieren altamente, mientras que aquellos con al menos el 98-99% de identidad se prefieren más altamente, y aquellos con al menos el 99% de identidad son los más altamente preferidos. Tales polinucleótidos incluyen un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos contenida en la SEC ID N°: 1 que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 2.

Los polinucleótidos adicionales descritos en este documento incluyen polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70% de identidad, preferiblemente al menos el 80% de identidad, más preferiblemente al menos el 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos el 95% de identidad, con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la SEC ID N°: 2, en toda la región codificante. En este aspecto, los polipéptidos que tienen al menos el 97% de identidad se prefieren altamente, mientras que aquellos con al menos el 98-99% de identidad se prefieren más altamente, y aquellos con al menos el 99% de identidad son los más altamente preferidos.

Los polipéptidos adicionales descritos en este documento incluyen polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70% de identidad, preferiblemente al menos el 80% de identidad, más preferiblemente al menos el 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos el 95% de identidad, con la SEC ID N°: 1 en toda la longitud de la SEC ID N°: 1. En este aspecto, los polipéptidos que tienen al menos el 97% de identidad se prefieren altamente, mientras que aquellos con al menos el 98-99% de identidad se prefieren más altamente, y aquellos con al menos el 99% de identidad son los más altamente preferidos. Tales polinucleótidos incluyen un polinucleótido que comprende el polinucleótido de la SEC ID N°: así como el polinucleótido de la SEC ID N°: 1. Dicho polinucleótido puede insertarse en un plásmido adecuado o vector de microorganismo recombinante y usarse para inmunización (véase por ejemplo el documento de Wolff y col., Science 247:1465-1468 (1990); Corr y col., J. Exp. Med. 184:1555-1560 (1996); Doe y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8578-8583 (1996)). Se describen también polinucleótidos que son complementarios a todos los polinucleótidos descritos anteriormente.

La invención proporciona también uso de un fragmento de un polinucleótido CASB618 en la fabricación de un medicamento que cuando se administra a un sujeto tiene las mismas propiedades inmunogénicas que el polinucleótido de la SEC ID N°: 1.

La invención proporciona también uso de un polinucleótido que codifica un fragmento inmunológico de un polipéptido CASB618 como se ha definido anteriormente en este documento.

La secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 muestra homología con el clon 163_P_10 map 15 del cromosoma 15 de *Homo Sapiens* (entrada GB_HTG4:AC009700). La secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 es una secuencia de ADNc y comprende una secuencia codificante de un polipéptido (nucleótidos 259 a 1219) que codifica un polipéptido de 320 aminoácidos, el polipéptido de la SEC ID N°: 2. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 2 puede ser idéntica a la secuencia que codifica el polipéptido contenido en la SEC ID N°: 1 o puede ser una secuencia diferente de una contenida en la SEC ID N°: 1, que, como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, codifica también el polipéptido de la SEC ID N°: 2. El polipéptido de la SEC ID N°: 2 no está relacionado con ninguna otra proteína de función conocida, excepto con la proteína c06e 1.3 de 42,1 kd hipotética de *Caenorhabditis elegans* (entrada P34298).

Los polipéptidos y polinucleótidos preferidos para los usos de la presente invención se espera que tengan, entre otros, funciones/propiedades biológicas similares a sus polipéptidos y polinucleótidos homólogos. Además, los polipéptidos preferidos, fragmentos inmunológicos y polinucleótidos para los usos de la presente invención tiene al menos una actividad de la SEC ID N°: 1 o de la SEC ID N°: 2, como sea apropiado.

La presente invención se refiere también a usos de secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas parciales u otras incompletas que se identificaron primero previamente a la determinación de las secuencias de longitud completa correspondientes de la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos para un polinucleótido aislado que:

- (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70% de identidad, preferiblemente al menos el 80% de identidad, más preferiblemente al menos el 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos el 95% de identidad, incluso más preferiblemente el 97-99% de identidad con la SEC ID N°: 3 en toda la longitud de la SEC ID N°: 3;

- (b) tiene una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos el 70% de identidad, preferiblemente al menos el 80% de identidad, más preferiblemente al menos el 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos el 95% de identidad, incluso más preferiblemente al menos el 97-99% de identidad, con la SEC ID N°: 1 en toda la longitud de la SEC ID N°: 3;

- (c) el polinucleótido de la SEC ID N°: 3.

La secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 3 deriva de secuencias EST (señal de secuencia expresada). Los especialistas en la técnica reconocen que serán inevitables algunos errores de lectura de la secuencia de nucleótidos en las secuencias EST (véase el documento de Adams, M.D. y col., *Nature* 377 (supp) 3, 1995). Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 3 se somete por lo tanto a las mismas limitaciones inherentes en la exactitud de la secuencia.

Los polinucleótidos descritos en este documento pueden obtenerse usando técnicas de clonación y detección convencionales, a partir de una biblioteca de ADNc derivada de ARNm de células de cáncer de colon humano, cáncer de pulmón, cáncer uterino y tejidos fetales (por ejemplo, el documento de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Pueden obtenerse también los polinucleótidos de la invención a partir de fuentes naturales tales como bibliotecas de ADN genómico o pueden sintetizarse usando técnicas bien conocidas y disponibles en el mercado.

Cuando los polinucleótidos descritos en este documento se usan para la producción recombinante de polipéptidos descritos en este documento, el polinucleótido puede incluir la secuencia codificante del polipéptido maduro, por sí mismo; o la secuencia codificante del polipéptido maduro en fase de lectura con otras secuencias codificantes, tales como las que codifican una secuencia líder o secretora, una secuencia de pre-, pro- o prepro-proteína, u otras porciones de péptidos de fusión. Por ejemplo, puede codificarse una secuencia marcadora que facilite la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, como se proporciona en el vector pQE (Quiagen, Inc.) y se describe en el documento de Gentz y col., *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86:821-824, o es una señal de HA. El polinucleótido puede contener también secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como secuencias transcritas no traducidas, señales de empalme y poliadenilación, sitios de unión de ribosomas y secuencias que estabilizan el ARNm.

Las realizaciones adicionales descritas en este documento incluyen polinucleótidos que codifican variantes de polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y en los que varios, por ejemplo de 5 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, de 1 a 2 o 1 restos de aminoácidos están sustituidos, delecionados o añadidos, en cualquier combinación.

Los polinucleótidos que son idénticos o suficientemente idénticos a una secuencia de nucleótidos contenida en la SEC ID N°: 1 pueden usarse como sondas de hibridación para ADNc y ADN genómico o como cebadores para una reacción de amplificación de ácidos nucleicos (PCR), para aislar ADNc de longitud completa y clones genómicos que codifican polipéptidos de la presente invención y para aislar ADNc y clones genómicos de otros genes (incluyendo genes que codifican parálogos de fuentes humanas y ortólogos y parálogos de especies diferentes del ser humano) que tienen una similitud de secuencia alta con la SEC ID N°: 1. Típicamente, estas secuencias de nucleótidos son el 70% idénticas, preferiblemente el 80% idénticas, más preferiblemente el 90% idénticas, lo más preferiblemente el 95% idénticas con la de la referente. Las sondas o cebadores comprenderán generalmente al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 30 nucleótidos y pueden tener al menos 50 nucleótidos. Las sondas particularmente preferidas tendrán entre 30 y 50 nucleótidos. Los cebadores particularmente preferidos tendrán entre 20 y 25 nucleótidos. En particular, podrían usarse polipéptidos o polinucleótidos derivados de secuencias de origen animal homólogo como inmunógenos para obtener una respuesta inmune de reacción cruzada al gen humano.

Un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en este documento, que incluye homólogos de especies diferentes del ser humano, puede obtenerse por un procedimiento que comprende las etapas de detectar una biblioteca apropiada en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 1 o un fragmento de la misma; y aislar el ADNc de longitud completa y clones genómicos que contienen dichas secuencias polinucleotídicas. Tales técnicas de hibridación las conoce bien el técnico experimentado. Las condiciones de hibridación rigurosas preferidas incluyen incubación durante toda la noche a 42°C en una solución de comprende: formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10% y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y roto; seguido por lavado de los filtros en SSC 0,1x a aproximadamente 65°C. De este modo la presente invención incluye también polinucleótidos obtenibles detectando una biblioteca apropiada en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 1 o un fragmento de la misma.

El técnico especialista apreciará que, en muchos casos, una secuencia de ADNc aislada estará incompleta, en que la región codificante para el polipéptido es corta en el extremo 5' del ADNc.

Existen varios procedimientos disponibles y bien conocidos por los especialistas en la técnica para obtener ADNc de longitud completa, o para extender ADNc corto, por ejemplo los basados en el procedimiento de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) (véase, por ejemplo, el documento de Frohman y col., *PNAS USA* 85, 8998-9002, 1988). Modificaciones recientes de la técnica, ejemplificadas por las tecnología Marathon™ (Clontech Labora-

tories Inc) por ejemplo, han simplificado de manera significativa la búsqueda de ADNc más largos. En la tecnología Marathon™, se han preparado ADNc a partir de ARNm extraído de un tejido elegido y un “adaptador” de secuencia ligado en cada extremo. Se realiza después amplificación de ácidos nucleicos (PCR) para amplificar el extremo 5’ “que falta” del ADNc usando una combinación de cebadores oligonucleotídicos específicos del adaptador y específicos del gen. Se repite después la reacción de PCR usando cebadores “anidados”, es decir, cebadores diseñados para hibridar dentro del producto amplificado (típicamente un cebador específico del adaptador que hibrida adicionalmente en 3’ en la secuencia del adaptador y un cebador específico del gen que hibrida adicionalmente en 5’ en la secuencia del gen conocida). Los productos de esta reacción pueden analizarse después secuenciando ADN y puede construirse un ADNc de longitud completa uniendo el producto directamente al ADNc existente para dar una secuencia completa, o realizando una PCR de longitud completa separada usando la nueva información de secuencia para el diseño del cebador 5’.

Los polipéptidos recombinantes descritos en este documento pueden prepararse por procedimientos bien conocidos en la técnica de células hospedadoras genéticamente modificadas que comprenden sistemas de expresión.

Para producción recombinante, pueden modificarse genéticamente las células hospedadoras para que incorporen sistemas de expresión o porciones de los mismos para polinucleótidos descritos en este documento. Puede efectuarse la introducción de polinucleótidos en células hospedadoras por procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como el de Davis y col., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) y el de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Tales procedimientos preferidos incluyen, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección.

Preferiblemente, las proteínas descritas en este documento se coexpresan con tioredoxina en trans (TIT). La coexpresión con tioredoxina en trans se prefiere frente a cis para mantener el antígeno libre de tioredoxina sin necesidad de proteasas. La coexpresión con tioredoxina facilita la solubilización de las proteínas de la invención. La coexpresión con tioredoxina tiene también un impacto significativo sobre el rendimiento de la purificación de la proteína, sobre la solubilidad de la proteína purificada y sobre la calidad.

Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de *Streptococci*, *Staphylococci*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levaduras y células de *Aspergillus*; células de insectos tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, células animales tales como células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 y del melanoma de Bowes; y células de plantas.

Puede usarse una gran diversidad de sistemas de expresión, por ejemplo sistemas cromosómicos, episomales y derivados de virus, por ejemplo vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levaduras, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levaduras, de virus tales como bacteriovirus, papovavirus, tales como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulen así como susciten la expresión. Generalmente, puede usarse cualquier sistema o vector que sea capaz de mantener, propagar o expresar un polinucleótido para producir un polipéptido en un hospedador. Puede insertarse la secuencia de nucleótidos apropiada en un sistema de expresión por cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como, por ejemplo, las expuestas en el documento de Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (*supra*). Pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido deseado para permitir la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplasmático, el espacio periplásmico o el ambiente extracelular. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

El sistema de expresión pueden ser también un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o una bacteria. El gen de interés puede insertarse en el genoma de un virus o bacteria recombinantes vivos. La inoculación e infección *in vivo* con este vector vivo conducirá a la expresión *in vivo* del antígeno y a la inducción de respuestas inmunes. Los virus y bacterias usados para este propósito son por ejemplo: poxvirus (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar, viruela del canario), alfavirus (virus Sindbis, virus Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana), adenovirus, virus adeno-asociados, picomavirus (poliovirus, rinovirus, herpesvirus (virus de la varicela zoster, etc), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, BCG. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos, o atenuados de diversas formas para obtener vacunas vivas. Tales vacunas vivas también forman parte de la invención.

Los polipéptidos descritos en este documento pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes por procedimientos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina. Más preferiblemente, se emplea cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC) para la purificación. Pueden emplearse técnicas bien conocidas para replegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el péptido se desnaturaliza durante la síntesis intracelular, aislamiento o purificación.

Otro aspecto importante de la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de un medicamento para inducir, reforzar o modular una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende inocular al mamífero con un fragmento o el polipéptido o polinucleótido completos descritos en este documento adecuados para producir respuesta inmune de anticuerpos y/o de células T para profilaxis o tratamiento terapéutico de cáncer, enfermedades autoinmunes y afecciones relacionadas. Otro aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de un medicamento para inducir, reforzar o modular la respuesta inmunológica en un mamífero que comprende administrar un polipéptido descrito en este documento por medio de un vector o célula que dirige la expresión del polinucleótido y que codifica el polipéptido *in vivo* para inducir tal respuesta inmunológica que produzca respuestas inmunes para profilaxis o tratamiento en dicho mamífero de las enfermedades.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de una formulación inmunológica/de vacuna (composición) que, cuando se introduce en un hospedador mamífero, induce, refuerza o modula una respuesta inmunológica en ese mamífero a un polipéptido de la presente invención donde la composición comprende un polipéptido o polinucleótido de la invención o un fragmento inmunológico del mismo como se ha definido anteriormente en este documento. La formulación de vacuna puede comprender además un vehículo adecuado. Ya que un polipéptido puede romperse en el estómago, se administra preferiblemente de forma parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven la solución isotónica con la sangre del recipiente; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados y pueden almacenarse en un estado liofilizado que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a la inducción *in vitro* de respuestas inmunes a un fragmento o el polipéptido o polinucleótido completos descritos en este documento o una molécula que comprende el polipéptido o polinucleótido descritos en este documento, usando células del sistema inmune de un mamífero y reinfundiendo estas células inmunes activadas del mamífero para el tratamiento de la enfermedad. La activación de las células del sistema inmune se logra por incubación *in vitro* con el polipéptido o polinucleótido completos descritos en este documento o una molécula que comprende el polipéptido o polinucleótido descritos en este documento en presencia o ausencia de diversas moléculas inmunomoduladoras. Un aspecto adicional de la invención se refiere a la inmunización de un mamífero por la administración de células que presentan antígenos modificadas *in vitro* que cargan con parte o el polipéptido completo descrito en este documento o una molécula que comprende el polipéptido descrito en este documento y administrada *in vivo* de una forma inmunogénica. Como alternativa, las células que presentan antígenos pueden transfectarse *in vitro* con un vector que contiene un fragmento o el polinucleótido completo descrito en este documento o una molécula que comprende el polinucleótido descrito en este documento, de forma que exprese el polipéptido correspondiente, y administrada *in vivo* de una forma inmunogénica.

La formulación de vacuna de la invención puede incluir también sistemas adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación. Preferiblemente, el sistema adyuvante provoca preferentemente una respuesta de tipo TH1.

Puede distinguirse ampliamente una respuesta inmune en dos categorías extremas, que son unas respuestas inmunes humorales o mediadas por células (caracterizadas tradicionalmente por anticuerpos y mecanismos efectores celulares de protección respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas tipo TH1 (respuesta mediada por células), y respuesta inmune tipo TH2 (respuesta humoral).

Las respuestas inmunes tipo TH1 extremas pueden caracterizarse por la generación de linfocitos T citotóxicos de haplotipo restringido, específicos de antígeno, y respuestas de células asesinas naturales. Las respuestas tipo TH1 en ratones se caracterizan a menudo por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano estos corresponden a anticuerpos tipo IgG1. Las respuestas inmunes tipo TH2 se caracterizan por la generación de un amplio intervalo de isotipos de inmunoglobulina que incluyen en el ratón IgG1, IgA e IgM.

Puede considerarse que la fuerza impulsora detrás del desarrollo de estos tipos de respuestas inmunes son las citoquinas. Niveles altos de citoquinas tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células al antígeno dado, mientras que niveles altos de citoquinas tipo TH2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

La distinción de respuestas inmunes tipo TH y TH2 no es absoluta. En la realidad, un individuo soportará una respuesta inmune que se describe como predominantemente TH1 o predominantemente TH2. Sin embargo, es a menudo conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de lo descrito en clones de células T CD4 +ve de ratón por Mosmann y Coffman (*Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 y TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173*) Tradicionalmente, las respuestas tipo TH1 se asocian con la producción de las citoquinas INF- γ e IL-2 por linfocitos T. Otras citoquinas asociadas a menudo directamente con la inducción de respuestas inmunes tipo TH1 no se producen por células T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas tipo TH2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

Se sabe que ciertos adyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de citoquinas tipo TH1 o TH2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio TH1:TH2 de la respuesta

inmune después de una vacunación o infección incluyen la medida directa de la producción de citoquinas TH1 o TH2 por linfocitos T *in vitro* después de re-estimulación con antígeno, y/o la medida de la proporción IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpos específicos de antígenos.

5 De ese modo, un adyuvante tipo TH1 es uno que preferentemente estimula poblaciones de células T aisladas para producir niveles altos de citoquinas tipo TH1 cuando se re-estimulan con un antígeno *in vitro*, y promueve el desarrollo tanto de linfocitos T citotóxicos CD8+ como de respuestas de inmunoglobulinas específicas de antígenos asociadas con el isotipo tipo TH1.

10 En las Solicitudes de Patente Internacional N° WO 94/00153 y WO 95/17209 se describen los adyuvantes que son capaces de estimular preferentemente la respuesta celular TH1.

15 El monofosforil lípido A 3 de-O-acilado (3D-MPL) es uno de tales adyuvantes. Éste se conoce por el documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente, es una mezcla de monofosforil lípido A 3 de-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas y lo fabrica Ribi Immunochem, Montana. En la Patente Europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) se describe una forma preferida del monofosforil lípido A 3 de-O-acilado.

20 Preferiblemente, las partículas de 3D-MPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros (Patente Europea N° 0 689 454). 3D-MPL estará presente en el intervalo de 10 µg-100 µg, preferiblemente 25-50 µg por dosis en la que el antígeno estará presente típicamente en un intervalo de 2-50 µg por dosis.

25 Otro adyuvante preferido comprende QS21, una fracción no tóxica purificada por HPLC derivada de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. Opcionalmente, ésta puede mezclarse con monofosforil lípido A 3 de-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente junto con un vehículo.

El procedimiento de producción de QS21 se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540.

30 Las formulaciones de adyuvantes no reactogénicos que contienen QS21 se han descrito previamente (documento WO 96/33739). Tales formulaciones que comprenden QS21 y colesterol han mostrado que son adyuvantes que estimulan a TH1 con éxito cuando se formulan junto con un antígeno.

35 Los adyuvantes adicionales que son estimuladores preferentes de la respuesta celular TH1 incluyen oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo secuencias CpG no metiladas, como se describen en el documento WO 96/02555.

40 También se contemplan combinaciones de diferentes adyuvantes que estimulan a TH1, tales como las mencionadas en este documento anteriormente, para proporcionar un adyuvante que sea un estimulador preferente de la respuesta celular TH1. Por ejemplo, QS21 puede formularse junto con 3D-MPL. La proporción de QS21:3D-MPL estará típicamente en el orden de 1:10 a 10:1, preferiblemente de 1:5 a 5:1 y a menudo sustancialmente 1:1. El intervalo preferido para una sinergia óptima es de 2,5:1 a 1:1 de 3D-MPL:QS21.

45 Preferiblemente está también presente un vehículo en la composición de vacuna de acuerdo con la invención. El vehículo puede ser una emulsión de aceite en agua, o una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

50 Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un aceite metabolizable, tal como esqualeno, alfa tocoferol y Tween 80. En un aspecto particularmente preferido se combinan en tal emulsión los antígenos en la composición de vacuna de acuerdo con la invención con QS21 y 3D-MPL. Adicionalmente, la emulsión de aceite en agua puede contener span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

55 Típicamente para administración a seres humanos, estarán presentes QS21 y 3D-MPL en una vacuna en el intervalo de 1 µg-200 µg, tal como 10-100 µg, preferiblemente 10 µg-50 µg por dosis. Típicamente, el aceite en agua comprenderá del 2 al 10% de esqualeno, del 2 al 10% de alfa tocoferol y del 0,3 al 3% de tween 80. Preferiblemente la proporción esqualeno:alfa tocoferol es igual o menor de 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. Puede estar presente también span 85 a un nivel del 1%. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador.

60 Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas contienen preferiblemente un aceite no tóxico, por ejemplo esqualano o esqualeno, un emulsivo, por ejemplo, Tween 80, en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

65 En el documento WO 95/17210 se describe una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua.

La presente invención proporciona también un uso de composición de vacuna polivalente que comprende una formulación de vacuna de la invención en combinación con otros antígenos, en particular de antígenos útiles para la

fabricación de medicamento para tratar cánceres, enfermedades autoinmunes y afecciones relacionadas. Tal composición de vacuna polivalente puede incluir un adyuvante que induce a TH1 como se ha descrito anteriormente en este documento.

5 Esta invención se refiere también al uso de polinucleótidos, en forma de cebadores derivados de polinucleótidos de la presente invención, y de polipéptidos, en forma de anticuerpos o reactivos específicos para el polipéptido de la presente invención, como reactivos de diagnóstico.

10 La identificación de marcadores genéticos o bioquímicos en sangre o tejidos que permitan la detección de cambios muy tempranos a lo largo del curso de la carcinogénesis ayudará en la determinación del mejor tratamiento para el paciente. Pueden usarse marcadores tumorales sustitutos, tales como expresión de polinucleótidos, para diagnosticar diferentes formas y estados del cáncer. La identificación de los niveles de los polinucleótidos de la invención será útil tanto en la determinación de la etapa del trastorno canceroso como en la gradación de la naturaleza del tejido canceroso. El procedimiento de determinación de la etapa controla el avance del cáncer y se determina con la presencia o ausencia del tejido maligno en las áreas en las que se ha hecho la biopsia. Los polinucleótidos de la invención pueden ayudar a perfeccionar el proceso de determinación de la etapa identificando marcadores para la agresividad de un cáncer, por ejemplo la presencia en diferentes áreas del cuerpo. La gradación del cáncer describe si un tumor se parece mucho al tejido normal de su mismo tipo y se valora por su morfología celular y otros marcadores de diferenciación. Los polinucleótidos descritos en este documento pueden ser útiles en la determinación del grado del tumor ya que pueden 20 ayudar en la determinación del estado de diferenciación de las células de un tumor.

Los ensayos de diagnóstico ofrecen un procedimiento para diagnosticar o determinar una susceptibilidad a cánceres, enfermedades autoinmunes y afecciones relacionadas por diagnóstico con procedimientos que comprenden determinar a partir de una muestra derivada de un sujeto un nivel anormalmente disminuido o aumentado de polipéptido o ARNm. Este procedimiento de diagnóstico se conoce como expresión diferencial. Se compara la expresión de un gen particular entre un tejido enfermo y un tejido normal. Una diferencia entre el gen relacionado con el polinucleótido, ARNm o proteína en los dos tejidos comparados, por ejemplo en peso molecular, secuencia de aminoácidos o nucleótidos, o abundancia relativa, indica un cambio en el gen, o un que lo regula, en el tejido del ser humano que se sospechaba que estaba enfermo.

30 Puede medirse la expresión disminuida o aumentada en el nivel del ARN. Se aísla primero ARN PoliA a partir de dos tejidos y puede detectarse ARNm codificado por un gen que corresponde a polinucleótidos expresados de forma diferencial descritos en este documento, por ejemplo, por hibridación *in situ* en secciones de tejido, PCR con transcriptasa inversa, usando transferencias de Northern que contienen ARNm poli A+, o cualquier otro procedimiento de detección de ARN directo o indirecto. Una expresión aumentada o disminuida de un ARN dado en un tejido enfermo comparado con un tejido normal sugiere que el transcripto y/o la proteína expresada tiene un papel en la enfermedad. De ese modo, la detección de un nivel superior o inferior de ARNm correspondiente a la SEC ID N° 1 ó 3 en relación al nivel normal es indicativo de la presencia de cáncer en el paciente.

40 Los niveles de expresión de ARNm en una muestra pueden determinarse por generación de una biblioteca de señales de secuencia expresadas (ETS) a partir de la muestra. Se usa la representación relativa de EST en la biblioteca para valorar la representación relativa del transcripto del gen en la muestra de partida. El análisis de EST del ensayo puede compararse después con el análisis de EST de una muestra de referencia para determinar los niveles de expresión relativos del polinucleótido de interés.

45 Pueden realizarse otros análisis de ARNm usando metodología de análisis en serie de la expresión génica (SAGE) (velculescu y col., Science (1995) 270:484), metodología de presentación diferencial (por ejemplo, documento US 5.776.683) o análisis de hibridación que depende de la especificidad de las interacciones de nucleótidos.

50 Como alternativa, puede hacerse la comparación al nivel de proteína. Pueden compararse los tamaños de las proteína en los dos tejidos usando anticuerpos para detectar polipéptidos en transferencias de Western de extractos de proteínas de los dos tejidos. Pueden detectarse también los niveles de expresión y la localización subcelular inmunológicamente usando anticuerpos de la proteína correspondiente. Las técnicas de ensayo adicionales que pueden usarse para determinar los niveles de una proteína, tal como un polipéptido de la presente invención, en una muestra derivada de un hospedador, las conocen bien los especialistas en la técnica. Un nivel elevado o disminuido de expresión de un polipéptido en el tejido enfermo comparado con el mismo nivel de expresión de proteína en el tejido normal indica que la proteína expresada puede estar implicada en la enfermedad.

60 En los ensayos de la presente invención, puede determinarse el diagnóstico por detección de los niveles de expresión del producto génico codificado por al menos una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 1 ó 3. Puede usarse también una comparación de los niveles de ARNm o proteína en un tejido enfermo frente a uno normal para seguir la progresión o remisión de una enfermedad.

65 Pueden analizarse un gran número de secuencias polinucleotídicas en una muestra usando matrices polinucleotídicas. Estos pueden usarse para examinar la expresión diferencial de genes y para determinar la función del gen. Por ejemplo, pueden usarse matrices de las secuencias polinucleotídicas SEC ID N°: 1 ó 3 para determinar si cualquiera de los polinucleótidos se expresan de forma diferente entre una célula cancerígena y una normal. En una realización de la invención, puede construirse una serie de sondas de oligonucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos

SEC ID N°: 1 6 3 o fragmentos de las mismas para realizar detección eficaz de, por ejemplo, mutaciones genéticas. Los procedimientos de tecnología de matrices son bien conocidos y tienen aplicabilidad general y pueden usarse para abordar una diversidad de cuestiones en genética molecular que incluyen expresión del gen, enlace genético y variabilidad genética (véase por ejemplo el documento: M. Chee y col., Science, Vol 274, pp 610-613 (1996)). “Diagnóstico”, como se usa en este documento, incluye la determinación de la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad, la determinación de si un sujeto tiene la enfermedad actualmente, y también el pronóstico de un sujeto afectado por la enfermedad.

Las secuencias de nucleótidos descritas en este documento son también valiosas para localización cromosómica. La secuencia se dirige específicamente y puede hibridar con una localización particular en un cromosoma de un ser humano individual. El mapeado de secuencias relevantes de cromosomas de acuerdo con la presente invención es una primera etapa importante en la correlación de las secuencias con la enfermedad del gen asociada. Una vez que una secuencia se ha mapeado en una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma puede correlacionarse con los datos del mapa genético. Tales datos se encuentran, por ejemplo, en el documento de V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en internet por la Johns Hopkins University Welch Medical Library). Se identifica después la relación entre los genes y las enfermedades que se han mapeado en la misma región cromosómica por análisis de enlace (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes). Pueden determinarse también las diferencias en la secuencia de ADNc o genómica entre individuos afectados y no afectados.

Los polipéptidos descritos en este documento, o sus fragmentos o análogos de los mismos, o células que los expresan, pueden usarse también como inmunógenos para producir anticuerpos inmuno-específicos o polipéptidos de la presente invención. El término “inmuno-específico” significa que el anticuerpo tiene sustancialmente mayor afinidad por los polipéptidos de la invención que su afinidad por otros polipéptidos relacionados en la técnica anterior.

También se describe un anticuerpo inmuno-específico para un polipéptido descrito en este documento o un fragmento inmunológico del mismo como se ha definido anteriormente en este documento. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Pueden obtenerse anticuerpos generados contra polipéptidos descritos en este documento administrando los polipéptidos o fragmentos que soportan epítopes, análogos o células a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos de rutina. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Los ejemplos incluyen la técnica del hibridoma (Kohler, G. y Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de célula B humana (Kozbor y col., Immunology Today (1983) 4:72) y la técnica de hibridoma EBV (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Pueden adaptarse también técnicas de producción de anticuerpos de cadena única, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos N°: 4.946.778, para producir anticuerpos de cadena única de polipéptidos de esta invención.

Los anticuerpos descritos anteriormente pueden emplearse para aislar o para identificar clones que expresen el polipéptido o para purificar los polipéptidos por cromatografía de afinidad. El anticuerpo de la invención puede emplearse también para prevenir o tratar el cáncer, particularmente cáncer de ovarios y de colon, enfermedades autoinmunes y afecciones relacionadas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un medicamento para inducir o modular una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende inocular al mamífero con un polipéptido de la presente invención, adecuado para producir respuesta inmune de anticuerpos/o células T para proteger o mejorar los síntomas o progresión de la enfermedad. Otro aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un medicamento para inducir o modular la respuesta inmunológica en un mamífero que comprende administrar un polipéptido descrito en este documento por medio de un vector que dirige la expresión del polinucleótido y codifica el polipéptido *in vivo* para inducir tal respuesta inmunológica para producir anticuerpos que protejan a dicho animal de la enfermedad.

Se apreciará que la presente invención proporciona por lo tanto usos para la fabricación de un medicamento para tratar afecciones anormales tales como, por ejemplo, cáncer de colon, relacionado con la presencia, exceso o una baja expresión de la actividad del polipéptido CASB618.

El polipéptido descrito en este documento puede usarse para identificar receptores unidos a membrana o solubles, si alguno, por técnicas de unión al receptor convencionales conocidas en la técnica. Pueden usarse también procedimientos de detección bien conocidos para identificar agonistas y antagonistas del polipéptido descrito en este documento que compitan con la unión del polipéptido descrito en este documento a sus receptores, si alguno.

Se apreciará fácilmente por el técnico experimentado que puede usarse un polipéptido descrito en este documento en un procedimiento para el diseño basado en la estructura de un agonista, antagonista o inhibidor del polipéptido, por:

- (a) determinación en primera instancia de la estructura tridimensional del polipéptido;

- (b) deducción de la estructura tridimensional para el sitio o sitios de unión o reactivo más probables de un agonista, antagonista o inhibidor,
- (c) síntesis de compuestos candidatos que se predice que se unan o reaccionen con el sitio de unión o reactivo deducido; y
- (d) analizar si los compuestos candidatos son de hecho agonistas, antagonistas o inhibidores.

Puede emplearse terapia génica para lograr la producción endógena del polipéptido CASB618 por las células relevantes en el sujeto. Para una visión de conjunto de la terapia génica, véase el Capítulo 20 del documento Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, (y referencias citadas en el mismo) en Human Molecular Genetics, de T Strachan y A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

La preparación de vacunas se describe en general en los documentos Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach, editado por Powell and Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. La encapsulación dentro de liposomas la describe, por ejemplo, Fullerton, en la Patente de Estados Unidos 4.235.877. La conjugación de proteínas con macromoléculas la describen, por ejemplo, Likhite, en la Patente de Estados Unidos 4.372.945 y Armor y col., en la Patente de Estados Unidos 4.474.757.

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos de vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de inmunógeno específico que se emplea. Generalmente, se espera que cada dosis comprende 1-1000 μg de proteína, preferiblemente 2-100 μg , más preferiblemente 4-40 μg . Puede determinarse una cantidad óptima para una vacuna particular por estudios convencionales que implican observación de los títulos de anticuerpos y otras respuestas en sujetos. Posteriormente a la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4 semanas.

“Aislado” significa alterado “por la mano del hombre” del estado natural. Si una composición “aislada” o sustancia se encuentra en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente de forma natural en un animal viviente no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, como se emplea el término en este documento.

“Polinucleótido” se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado que incluye regiones de cadena única y doble.

“Variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia, pero mantiene propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden alterar o no la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden producir sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se analiza a continuación. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias están limitadas de forma que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante son muy similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y el polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones, deleciones en cualquier combinación. Un resto de aminoácido sustituido o insertado puede estar o no codificado por el código genético. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser una que se encuentre de forma natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se conoce que se encuentre de forma natural. Las variantes de polinucleótidos y polipéptidos que no se encuentran de forma natural pueden hacerse por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

“Identidad”, como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, como se determina por comparación de secuencias. En la técnica, “identidad” significa también el grado de relación de secuencia entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, como puede ser el caso, determinado por el emparejamiento entre cadenas de tales secuencias. La “identidad” y “similaridad” pueden calcularse fácilmente por procedimientos conocidos, que incluyen pero sin limitación los descritos en los documentos (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. *Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los procedimientos preferidos para determinar la identidad se diseñan para que den el emparejamiento más grande entre las secuencias analizadas. Los procedimientos para determinar la identidad y similaridad se codifican en programas de ordenador disponibles públicamente. Los procedimientos de programas de ordenador preferidos para determinar la identidad y similaridad entre las dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete del programa GCG (Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. y col., J. Molec. Biol. 215:403-410 (1990)). El programa BAST X esta disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Atschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., y col., J. Mol.

ES 2 273 670 T3

Biol. 215:403-410 (1990). Puede usarse también el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

El algoritmo preferido usado es FASTA. Los parámetros preferidos para la comparación de las secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas usando este algoritmo incluyen los siguientes:

Penalización de hueco: 12

Penalización de extensión de hueco: 4

Tamaño de palabra: 2, max. 6.

Los parámetros preferidos para la comparación de la secuencia polipeptídica con otros procedimientos incluyen los siguientes:

1) Algoritmo: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453 (1970)

Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikof and Hentikof, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)

Penalización de hueco: 12

Penalización de longitud de hueco: 4

Un programa útil con estos parámetros está disponible públicamente como el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto sin penalización para huecos extremos).

Los parámetros preferidos para comparación de polinucleótidos incluyen los siguientes:

1) Algoritmo: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453 (1970)

Matriz de comparación: emparejamientos = +10, desemparejamientos = 0

Penalización de hueco: 50

Penalización de longitud de hueco: 3

Un programa útil con estos parámetros está disponible públicamente como el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros mencionados anteriormente con los parámetros por defecto para comparaciones de polinucleótidos.

A modo de ejemplo, una secuencia polinucleotídica descrita en este documento puede ser idéntica a una secuencia de referencia de la SEC ID N° 1, es decir, es el 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos comparado con la secuencia de referencia. Tales alteraciones se seleccionan entre el grupo constituido por al menos una delección, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción de nucleótidos, y donde dichas alteraciones pueden encontrarse en las posiciones 5' ó 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en la SEC ID N°: 1 por el porcentaje numérico del porcentaje de identidad respectivo (dividido por 100) y restando ese producto de dicho número total de nucleótidos en la SEC ID N°: 1, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

donde n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos de la SEC ID N° 1, y es, por ejemplo, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,95 para el 95%, etc., y donde cualquier producto de x_n y y que no sea un número entero se redondea hacia abajo hasta el número entero más cercano. Las alteraciones de una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 2 pueden crear mutaciones sin sentido, con pérdida de sentido o de cambio de fase en esta secuencia codificante y de ese modo alteran el polipéptido codificado por el polinucleótido posteriormente a tales alteraciones.

De forma similar, una secuencia polipeptídica descrita en este documento puede ser idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia de la SEC ID N° 2, es decir, el 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia de forma que el % de identidad es menor del 100%. Tales alteraciones se seleccionan entre el grupo constituido por al menos una delección, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción de aminoácidos, y donde dichas alteraciones pueden ocurrir en

las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia del polipéptido de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácidos para un % dado de identidad se determina multiplicando el número total de nucleótidos en la SEC ID N°: 2 por el porcentaje numérico del porcentaje de identidad respectivo (dividido por 100) y restando después ese producto de dicho número total de nucleótidos en la SEC ID N°: 2, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

donde n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos de la SEC ID N° 2, y es, por ejemplo 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, etc., y donde cualquier producto de x_a e y que no sea un número entero se redondea hacia abajo hasta el número entero más cercano previamente a restarlo de x_a .

“Homólogo” es un término genérico usado en la técnica para indicar una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que posee un grado alto de relación de secuencia con una secuencia sujeto. Tal relación puede cuantificarse determinando el grado de identidad y/o similaridad entre las secuencias que se están comparando como se ha descrito anteriormente en este documento. Dentro de este término genérico están los términos “ortólogo”, que significa un polinucleótido o polipéptido que es el equivalente funcional de un polinucleótido o polipéptido de otra especie y “parálogo”, que significa una secuencia funcionalmente similar cuando se considera dentro de la misma especie.

Leyendas de las figuras

Figura 1

La Figura 1 muestra los niveles de expresión de CASB618 en muestras normales y tumorales de colon emparejadas. Los valores se dan en niveles de actina equivalentes.

N se refiere a colon normal, T se refiere a tumor de colon.

Figura 2

Las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D muestran los datos de PCR en tiempo real de la expresión de CASB618 en tejidos normales. Las abreviaturas significan:

Figura 2A: Co: colon; Ce: cervix; Bra: brain; Bo_Ma: médula ósea; Bl: vejiga; Ao: aorta; Ad_Gl: glándula adrenal.

Figura 2B: Ov: ovario; Oe: esófago; Ly_No: nódulo linfático; Lu: pulmón; Li: hígado; Ki: riñón; Il: íleon; He: corazón; Fa_Tu: trompas de falopio.

Figura 2C: Sp: bazo; Sm_In: intestino delgado; Sk_Mu: músculo esquelético; Sk: piel; Re: recto; Pr: próstata; Pl: placenta; Pa_Thy: glándula paratiroides.

Figura 2D: Tr: tráquea; Thy: tiroides; Te: testículos; St: estómago; Spl: bazo.

Figura 3

La Figura 3 muestra un gel de SDS-PAGE (12,5%) del extracto AR120/pRIT15081 de *E. coli*, con o sin inducción con ácido nalidíxico; revelado con anticuerpo monoclonal anti-NS 1.

El carril 1 es el marcador de peso molecular; el carril 2 muestra el AR120/pRIT15081 de *E. coli* de 3 h sin inducción; el carril 3 muestra el AR120/pRIT15081 de *E. coli* de 3 h inducido; el carril 4 muestra el AR120/pRIT15081 de *E. coli* de 4 h 30 sin inducción; el carril 5 muestra el AR120/pRIT15081 de *E. coli* de 4 h 30 inducido.

Figura 4

La Figura 4 muestra los geles de SDS-PAGE de CASB618 purificado.

Los carriles 1 y 8 muestran el marcador de peso molecular; el carril 2 muestra el sedimento de células lisadas; el carril 3 muestra la proteína purificada 3 antes de la diálisis; el carril 4 muestra la proteína dializada purificada; el carril 6 muestra la proteína dializada purificada de 0,22 μ m.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Análisis de RT-PCR en tiempo real*

Se usa RT-PCR en tiempo real (U. Gibson. 1996. Genome Research: 6.996) para comparar la abundancia del transcripto de ARNm del antígeno candidato en tejidos de colon tumorales y normales emparejados de múltiples pacientes. Además, se evalúan con este enfoque los niveles de ARNm del gen candidato en un grupo de tejidos normales.

Se extrae el ARN total de colon normal y tumoral de biopsias fijadas por congelación usando el reactivo TriPure (Boehringer). El ARN total de tejidos normales se adquiere de InVitrogen o se extrae de biopsias fijadas por congelación usando el reactivo TriPure. Se purifica el ARNm poli-A+ del ARN total después del tratamiento con ADNasa usando perlas magnéticas oligo-dT (Dynal). Se realiza la cuantificación del ARNm por espectrofluorimetría (VersaFluor, BioRad) usando colorante SybrII (Molecular Probes). Se diseñan cebadores para amplificación por PCR en tiempo real con el software Perkin-Elmer Primer Express usando opciones por defecto para condiciones de amplificación TaqMan.

Las reacciones en tiempo real se montan de acuerdo con protocolos de PCR convencionales usando 2 ng de ARNm purificado para cada reacción. Se añade colorante SybrI (Molecular Probes) a una dilución final de 1/75000 para detección en tiempo real. Se realiza amplificación (40 ciclos) y detección en tiempo real en un sistema Perkin-Elmer Biosystems PE7700 usando ajustes del instrumento convencionales. Se calculan los valores de Ct usando el software PE7700 Sequence Detector. Se obtienen dos valores de Ct para cada muestra del paciente: el tumor Ct (CtT) y el colon Ct normal emparejado (CtN). Los valores de Ct obtenidos por PCR en tiempo real se relacionan de forma logarítmica-lineal con el número de copia del molde diana. Ya que la eficacia de la amplificación de PCR en las condiciones experimentales prevalentes está cercana a la eficacia de amplificación teórica, $2^{(CtN-CtT)}$ es una estimación de los niveles relativos del transcripto en los dos tejidos (es decir, sobre-expresión de ARNm plegado en el tumor). Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron sobre biopsias de 23 pacientes. Algunas muestras de pacientes se midieron dos veces. El nivel de sobre-expresión del ARNm se calcula como se ha descrito para cada paciente. Se calculan después a partir de este conjunto de datos el nivel medio de sobre-expresión del ARNm para el antígeno candidato y la proporción de pacientes que sobre-expresan el antígeno candidato. Los valores individuales se estandarizan con respecto a la actina en la misma muestra (proporción) y se muestran en la figura 1. Un valor de 1 corresponde de ese modo al mismo nivel de expresión de actina. Los resultados se muestran en una escala logarítmica.

Se analizaron también con el mismo procedimiento un total de 81 muestras de tejido normal, que representan 28 tejidos diferentes. Se compararon los valores de Ct para el antígeno candidato con los de la actina obtenidos con la misma muestra de tejido. Los valores estandarizados se muestran en las figuras 2A-D.

40 *Resultados de PCR en tiempo real en muestras de cáncer de colon/colon normal*

Sumario

Pacientes que sobre-expresan CASB618 en tumores de colon (%)	Nivel medio de sobre-expresión en tumores de colon (veces)
18/23 (78%)	125

Conclusión: CASB618 se sobreexpresa en una proporción alta en tumores son respecto al colon adyacente normal. Se expresa sólo de forma marginal en otros tejidos normales, en particular en una muestra de próstata.

55 Ejemplo 2

Micromatrices de ADN

Se usan micromatrices de ADN para examinar los perfiles de expresión de ARNm de colecciones grandes de genes en muestras múltiples. Esta información se usa para complementar los datos obtenidos por PCR en tiempo real y proporcionan una medida independiente de los niveles de expresión génica en tejidos tumorales y normales.

Los ejemplos de tecnologías actuales para la producción de micro-matrices de ADN incluyen 1) Las matrices Affymetrix "GeneChip" en las que se sintetizan oligonucleótidos sobre la superficie del chip por síntesis química en fase sólida usando procedimientos fotolitográficos 2) tecnología de aplicación puntual de ADN en la que se depositan de forma robótica pequeños volúmenes de una solución de ADN y después se inmovilizan sobre la superficie de una fase sólida (por ejemplo, vidrio). En ambos casos, los chips se hibridan con ADNc o ARNc que se ha extraído del tejido de interés (por ejemplo, tejido normal, tumoral, etc...) y marcado con radiactividad o con una molécula

ES 2 273 670 T3

informadora fluorescente. El material marcado se hibrida con el chip y se determina la cantidad de sonda unida a cada secuencia sobre el chip usando un escáner especializado. El experimento puede prepararse con un informador fluorescente único (o radiactividad) o, como alternativa, puede realizarse usando dos informadores fluorescentes. En este último caso, cada una de las muestras se marca con una de las moléculas informadoras. Las dos muestras marcadas se hibridan después de forma competitiva con las secuencias del chip de ADN. Se determina la proporción de las dos señales fluorescentes para cada secuencia del chip. Esta proporción se usa para calcular la abundancia relativa del transcrito en las dos muestras. Los protocolos detallados están disponibles de varias fuentes incluyendo el documento "DNA Microarrays: A practical approach. Schena M. Oxford University Press 1999", la página Web (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/index.html>), <http://arrayit.com/DNA-Microarray-Protocols/>) y distribuidores especializados (por ejemplo, Affymetrix).

Ejemplo 3

Perfiles de EST

Un enfoque complementario a la caracterización de la expresión en tejido de antígenos experimentales es explorar la base de datos de "señales de secuencia expresadas" humana (EST). Las EST son fragmentos pequeños de ADNc hechos a partir de una colección de ARNm extraído de un tejido o línea celular particular. Tales bases de datos proporcionan actualmente una cantidad masiva de EST (10^6) a partir de varios cientos de bibliotecas de tejido ADNc, incluyendo tejidos tumorales de diversos tipos y estados de enfermedad. Por medio de herramientas informáticas (Blast), se realiza una búsqueda de comparación de la secuencia de CASB618 para tener una nueva percepción adicional de la expresión en tejidos.

Distribución de EST de CASB618

Categoría de descripción DbEST entrada ATG lib ID			
NCBI: 113567	8821	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 1224225	937	NCI_CGAP_Co2	TC
NCBI: 1271870	988	NCI_CGAP_Co12	TC
NCBI: 1316079	889	NCI_CGAP_Th1	TA
NCBI: 2035497	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2048268	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2054603	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2081390	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
LNCBI: 2129969	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2489139	1728	Soares_Dieckgraefe	Dc
NCBI: 2489206	1728	Soares_Dieckgraefe	Dc
NCBI: 2600163	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 2641414	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 2831741	937	NCI_CGAP_Co2	TC

NCBI: 2914582	910	NCI_CGAP_Pr22	NP
NCBI: 3111692	1728	Soares_Dieckgraefe	Dc
NCBI: 3112040	1728	Soares_Dieckgraefe	Dc
NCBI: 3043263	1460	NCI_CGAP_Pan1	Tep
NCBI: 3119272	1728	Soares_Dieckgraefe	Dc
INCBI: 3138950	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 3181303	1728	Soares_Dieckgraefe	Dc
NCBI: 2908798	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 2909226	937	NCI_CGAP_Co2	TC
TC: tumor de colon; Dc: colon enfermo; NP: próstata normal; Tep: tumor epitelial; Ta: otro tipo de tumor.			

La alta proporción de EST de cáncer de colon sugiere claramente de ese modo una sobreexpresión de este gen en el cáncer de colon. Adicionalmente, otros tumores (páncreas, tiroides) podrían expresar también el gen.

Ejemplo 4

Análisis de transferencia de Northern-Southern

Se amplifican por Advantage PCR cantidades limitadas de ADNc de colon tumoral mezclado y normal emparejado (véase anteriormente). Se amplifica también usando el mismo procedimiento ARN mensajero de múltiples tejidos normales. El ADNc amplificado (1 μ g) se electroforiza sobre un gel de agarosa al 1,2% y se transfiere sobre una membrana de nylon. La membrana se hibrida (AlkPhos Direct System) con una sonda preparada usando un fragmento del ADNc TAA candidato. El análisis de Northern-Southern proporciona información sobre el tamaño del transcripto, presencia de variantes de empalme y abundancia del transcripto en tejidos tumorales y normales.

Ejemplo 5

Análisis de transferencia de Northern

Se producen transferencias de Northern de acuerdo con protocolos convencionales usando 1 μ g de ARNm poli A+. Se preparan sondas radiactivas usando el sistema Ready-to-Go (Pharmacia).

Ejemplo 6

Identificación de la secuencia de ADNc de longitud completa

Se construyen bibliotecas de ADNc de tumores de colon usando el sistema Lambda Zap II (Stratagene) a partir de 5 μ g de ARNm poli A+. Se sigue el protocolo suministrado excepto que se usa SuperscriptII (Life Technologies) para la etapa de transcripción inversa. Se construyen bibliotecas preparadas con oligo dT y preparadas aleatoriamente. Se colocan en placas aproximadamente $1,5 \times 10^6$ fagos independientes para cada detección de la biblioteca. Las placas de fagos se transfieren sobre filtros de nylon y se hibridan usando una sonda de ADNc marcada con AlkPhos Direct. Los fagos positivos se detectan por quimioluminiscencia. Los fagos positivos se eliminan de la placa de agar, se eluyen en 500 μ l de tampón SM y se confirman por PCR específica del gen. Los fagos eluidos se transforman en bacteriófagos M13 de cadena única por eliminación *in vivo*. El bacteriófago se transforma después en ADN de plásmido de doble cadena por infección de *E. coli*. Las bacterias infectadas se siembran en placas y se someten a una segunda ronda de detección con la sonda de ADNc. Se purifica el ADN del plásmido de los clones bacterianos positivos y se secuencian en ambas cadenas.

Cuando el gen de longitud completa no puede obtenerse directamente a partir de la biblioteca de ADNc, se aísla la secuencia que falta usando la tecnología RACE (Marathon Kit, ClonTech.). Este enfoque depende de la transcripción inversa de ARNm a ADNc de doble cadena, ligación de engarces en los extremos del ADNc y amplificación de la extremidad deseada del ADNc usando un cebador específico del gen y uno de los oligonucleótidos de engarce. Los productos de la PCR Marathon se clonan en un plásmido (pCRIL.TPO, InVitrogen) y se secuencian.

La secuencia obtenida (SEC ID N°: 1) tiene una fase de lectura abierta supuesta de 259 aminoácidos (SEC ID N°: 2). La secuencia de la proteína deducida se sometió a algoritmos de predicción para localización celular (PSORT: <http://psort.nibb-ac.jp/> y TopPred: http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2_source.html). Se predice que tiene de 4 a 5 segmentos transmembrana; sólo uno de los 2 procedimientos usados predice la secuencia señal. Hay un motivo de cremallera de leucina potencial que se superpone sobre uno de los segmentos transmembrana predichos. Hay 3 sitios de N-glicosilación potencial. La localización subcelular no está clara, siendo la membrana plasmática la más probable.

Ejemplo 7

7.1 Expresión y purificación de antígenos específicos de tumores

La expresión en hospedadores microbianos, o como alternativa la transcripción/traducción *in vitro*, se usan para producir el antígeno de la invención para propósitos de vacuna y para producir fragmentos de proteína o la proteína completa para purificación rápida y generación de anticuerpos necesarios para la caracterización de la proteína expresada de forma natural por inmunohistoquímica o para el seguimiento de la purificación.

Pueden expresarse proteínas recombinantes en dos hospedadores microbianos, *E. coli* y levaduras (tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*). Esto permite la selección del sistema de expresión con las mejores características para esta producción de antígeno particular. En general, el antígeno recombinante se expresará en *E. coli* y la proteína de reacción se expresará en levaduras.

La estrategia de expresión implica primero el diseño de la estructura primaria del antígeno recombinante. En general, se coloca una pareja de fusión de expresión (EFP) en el extremo N-terminal para mejorar los niveles de expresión que podría incluir también una región útil para modular las propiedades inmunogénicas del antígeno, una pareja de fusión inmune (IFP). Además, se incluye en el extremo C-terminal una pareja de fusión de afinidad (AFP) útil para facilitar adicionalmente la purificación.

Cuando estén disponibles las cepas recombinantes, el producto recombinante se caracteriza por la evaluación del nivel de expresión y la predicción de solubilidad adicional de la proteína por análisis del comportamiento en el extracto bruto.

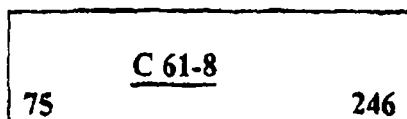
Después del crecimiento en medio de cultivo apropiado e inducción de la expresión de la proteína recombinante, los extractos totales se analizan por SDS-PAGE. Las proteínas recombinantes se visualizan en geles teñidos y se identifican por análisis de transferencia de Western usando anticuerpos específicos.

Una evaluación comparativa de las diferentes versiones del antígeno expresado permitirán la selección del candidato más prometedor a usar para purificación adicional y evaluación inmunológica.

Expresión en *E. coli* AR120

Se diseñó y se hizo la siguiente construcción: se clonó el gen CASB618 que porta delecciones del N-terminal y C-terminal (Δ 1-74; Δ 247-320 aa) en el vector pMG81 (pr PI largo), con la adición de un IFP (secuencia de ADN NS1 que codifica los aminoácidos 1 a 81 N-terminales de la proteína NS1 o del virus de la gripe) en el N-terminal, y una marca de histidina C-terminal (SEC ID N°: 4)

NS1- Met Thr Met



Thr Ser Gly HIS6x

El plásmido obtenido se llama pRIT 15081. Se usa la célula hospedadora *E. coli* AR 120 inducible con ácido nalidíxico. Se obtuvo la inducción de tres litros de cultivo de *E. coli* en medio LB + canamicina añadiendo ácido nalidíxico a una concentración final de 60 ng/ml. Los cultivos se incubaron 4 h 30 a 37°C.

El sedimento obtenido después de la centrifugación de los cultivos inducidos se resuspendió en 60 ml de tampón PBS. Las células se lisaron posteriormente usando una prensa francesa. El lisado se centrifugó después durante 20 minutos a 16000 g. Se descubrió la proteína expresada en el sedimento (figura 3).

El esquema de purificación sigue un enfoque clásico basado en la presencia de una marca de afinidad de His en la proteína recombinante. En un experimento típico, las células alteradas se filtraron y los extractos acelulares se cargaron en una cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC; Ni⁺⁺NTA de Quiagen) que retendrá específicamente la proteína recombinante. Las proteínas retenidas se eluyen con un gradiente de imidazol 0-500 mM (posiblemente en presencia de un detergente) en un tampón de fosfato.

ES 2 273 670 T3

El esquema de purificación se detalla a continuación.

5

Solubilización del sedimento en
GuHCl 6 M



10

IMAC: Qiagen NTA Ni⁺⁺

15

Tampón de equilibrio : NaH₂PO₄ 100 PH 8
Tris 10 mM
NaCl 150 mM
GuHCl 6 M

20

Muestra : sedimento en GuHCl 6 M

25

Tampón de lavado: NaH₂PO₄ 100 mM PH 6,3
Tris 10 mM
urea 8 M

30

Tampón de elución: NaH₂PO₄ 100 mM PH 4,5
Tris 10 mM
Imidazol 500 mM
urea 8 M

35



40

Proteína eluida en imidazol 500 mM + urea 8 M



45

DIALISIS

50

- PBS PH 7,5 + sarcosil al 2% + urea 6 M 1 h
- " urea 4 M 1 h
- " urea 2 M 1 h
- " urea 0 M
durante toda la
noche 4°C



55

congelación, filtración 0,22µm

60

Se obtiene una estimación de la concentración final (1 mg/ml) por un ensayo de proteínas de Lowry sobre el producto purificado final (véase la figura 4).

Transcripción/traducción *in vitro*

65

El producto del gen CASB618 se caracterizó por transcripción/traducción unida *in vitro*. Se clonó la secuencia codificante de longitud completa del clon CASB618 en el vector SP72 (Promega), un vector que permite transcripción *in vitro*. La expresión *in vitro* usando lisado de reticulocitos unidos a TNT T7 (Promega cat. n° L4611) con incorporación

ES 2 273 670 T3

de metionina S35 muestra un producto de 35 Kd, que se reduce a 30 kd en presencia de membranas microsomales pancreáticas caninas (Promega cat. N° Y4041). Este resultado sugiere el procesamiento del péptido señal de acuerdo con la predicción de péptido señal de 47 aminoácidos, y sugiere que la proteína *in vivo* está anclada a la membrana o se secreta. Para estos experimentos, se siguieron los protocolos recomendados por Promega.

7.2 Producción de anticuerpos e inmunohistoquímica

Pueden usarse cantidades pequeñas de proteína relativamente purificada para generar herramientas inmunológicas para

- a) detectar la expresión por inmunohistoquímica en secciones de tejidos normales o cancerígenos;
- b) detectar la expresión, y seguir la proteína durante el procedimiento de purificación (ELISA/Transferencia de Western); o
- c) caracterizar/cuantificar la proteína purificada (ELISA).

7.2.1. Anticuerpos Policlonales

Immunización

Se inmunizan 2-3 conejos, de forma intramuscular (I.M.), 3 veces a intervalos de 3 semanas con 100 μ g de proteína, formulada en el adyuvante 3D-MPL/QS21. Tres semanas después de cada inmunización se toma una muestra de sangre y se estima el título del anticuerpo en el suero por ELISA usando la proteína como antígeno de revestimiento siguiendo un protocolo convencional.

ELISA

Se revisten microplacas de 96 pocillos (maxisorb Nunc) con 5 μ g de proteína durante toda la noche a 4°C. Después de 1 hora de saturación a 37°C con PBS NCS al 1%, se añade la dilución en serie del suero del conejo durante 1 h a 37°C (comenzando por 1/10). Después de 3 lavados en PBS Tween, se añade anti-suero biotinilado anti-conejo (Amersham) (1/5000). Se lavan las placas y se añade estreptavidina unida a peroxidasa (1/5000) durante 30 min a 37°C. Después de lavar, se añaden 50 μ l de TMB (BioRad) durante 7 minutos y la reacción se para después con H₂SO₄ 0,2 M. Puede medirse la DO a 450 nm y calcularse las diluciones de punto medio por SoftmaxPro.

7.2.2 Anticuerpos monoclonales

Immunización

Se inmunizan 5 ratones BALB/c 3 veces a intervalos de 3 semanas con 5 μ g de proteína purificada, se realizan sangrías 14 días post II y 1 semana post 3. Se analiza en el suero por ELISA la proteína purificada usada como antígeno de revestimiento. Basándose en estos resultados (dilución de punto medio > 10000), se selecciona un ratón para fusión.

Fusión/selección HAT

Se fusionan células del bazo con el mieloma SP2/0 de acuerdo con un protocolo convencional usando PEG al 40% y DMSO al 5%. Las células se siembran en placas de 96 pocillos a $2,5 \times 10^4$ - 10^5 células/pocillo y se seleccionan los clones resistentes en medio HAT. En el sobrenadante de estos hibridomas se analiza su contenido en anticuerpos específicos y cuando sea positivo, se someterá a 2 ciclos de dilución limitada. Después de 2 rondas de detección, se elegirán 3 hibridomas para la producción de ascitis.

7.2.3 Inmunohistoquímica

Cuando estén disponibles los anticuerpos, se realiza inmunotinción de secciones de tejidos normales o cancerígenos, para determinar:

- el nivel de expresión del antígeno de la invención en cáncer en relación al tejido normal o
- la proporción de cáncer de un cierto tipo que expresa el antígeno
- si otros tipos de cáncer expresan también el antígeno
- la proporción de células que expresan el antígeno en un tejido cancerígeno

Preparación de la muestra de tejido

Después de la disección, la muestra de tejido se monta en un disco de corcho en compuesto OCT y se congela rápidamente en isopentano previamente a la supercongelación en nitrógeno líquido (-160°C). El bloque se conservará después a -70°C hasta su uso. Se realizarán secciones de 7-10 µm en una cámara de criostato (-20, -30°C).

Tinción

Las secciones de tejido se secan durante 5 min a temperatura ambiente (TA), se fijan en acetona durante 10 min a TA, se secan de nuevo y se saturan con suero PBS al 0,5% BSA al 5%. Después de 30 min a TA, se realiza una tinción directa o indirecta usando anticuerpos específicos del antígeno. Una tinción directa conduce a una mejor especificidad pero a una tinción menos intensa mientras que una tinción indirecta conduce a una tinción más intensa pero menos específica.

7.3 Análisis de las respuestas inmunes celulares humanas al antígeno de la invención

Puede valorarse la relevancia inmunológica del antígeno de la invención por sensibilización *in vitro* de células T humanas. Todas las líneas de linfocitos de células T y de células dendríticas derivan de PBMC (células mononucleares sanguíneas periféricas) de donantes sanos (preferido el subtipo HLA-A2). Se usa también un ratón transgénico HLA-A2.1/K^b para detectar los péptidos HLA-A2.1.

Se cultivan líneas celulares de células T CD8+ específicas de antígeno descubiertas recientemente y se mantienen por estimulación *in vitro* semanal. Se analiza la actividad lítica y la producción de γ-IFN de las líneas CD8 en respuesta al antígeno o péptidos derivados del antígeno usando procedimientos convencionales.

Se usan dos estrategias para cultivar las líneas de células T CD8+: una estrategia basada en péptidos y una estrategia basada en el gen completo. Ambas estrategias requieren el ADNc de longitud completa del antígeno descubierto recientemente en la fase de lectura correcta para clonarlo en un sistema de administración apropiado o para usarlo para predecir la secuencia de los péptidos de unión a HLA:

Enfoque basado en péptidos

Las secuencias del péptido de unión a HLA-A2 se predicen con el algoritmo de Parker (Parker, K. C., M. A. Bednarek, y J. E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J. Immunol. 152:163 y http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) o el procedimiento de Rammensee (Rammensee, Friede, Stevanovic, MHC ligands and peptide motifs: 1 st listing, Immunogenetics 41, 178-228, 1995; Rammensee, Bachmann, Stevanovic: MHC ligands and peptide motifs. Landes Bioscience 1997 y <http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm>). Los péptidos se detectan después en el modelo de ratón transgénico HLA-A2.1/K^b (Vitiello y col.). La secuencia usada para realizar la predicción es EPHB2v, ya que es idéntica a EPHB2 con una extensión de secuencia C-terminal adicional.

*a) Epítopes predichos que se unen al alelo HLA_A0201**a.1) Nonámeros HLA-A*0201*

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Valor Rammensee	Valor ^o Parker	SEC ID N ^o
262	F	L	G	G	A	V	V	S	L	31	226,014	5
24	L	L	I	V	I	L	V	F	L	30	459,398	6
253	T	L	A	T	G	V	L	C	L	29		7
203	P	L	Y	G	G	L	A	L	L	28		8
149	G	L	P	D	P	V	L	Y	L	28	1107,961	9
100	G	L	L	V	G	L	E	G	I	18		10

ES 2 273 670 T3

53	W L V R V L L S L	27	226,014	11
62	F I G A E I V A V	26	101,181	12
260	C L F L G G A V V	25	105,510	13
196	V L L S T P A P L	25	134,369	14
60	S L F I G A E I V	25		15
210	L L T T G A F A L	24	210,633	16
104	G L E G I N I T L	24		17
34	L A A S F L L I L	24		18
222	F A L A S I S S V	23		19
216	F A L F G V F A L	23		20
192	L L S N V L L S T	23		21
138	Y A A E Y A N A L	23		22
33	A L A A S F L L I	23		23
31	F L A L A A S F L	23	540,469	24
21	S V P L L I V I L	23		25
174	H L A G H Y A S A	22		26
112	L T G T P V H Q L	22		27
97	A R V G L L V G L	22		28
91	S A A R V T A R V	22		29
73	S A E X F V G T V	22		30
27	V I L V F L A L A	22		31
308	A A L P D L K C I	21		32
299	I L G D P L H K Q	21		33
258	V L C L F L G G A	21		34
217	A L F G V F A L A	21		35
207	G L A L L T T G A	21		36
40	L I L P G I R G H	21		37
16	H A A G F S V P L	21		38
312	D L K C I T T N L	20		39
234	P L R L G S S A L	20		40
209	A L L T T G A F A	20	101,099	41
26	I V I L V F L A L	20		42
17	A A G F S V P L L	20		43
154	V L Y L A E K F T		222,964	44

ES 2 273 670 T3

244	T Q Y G A A F W W		719,848	45
185	W V A F C F W L L		122,527	46
° Estimación del tiempo medio de disociación de una molécula que contiene esta secuencia				

a.2) Decámero HLA A02_01

Posición	Secuencia	Valor Rammensee*	Valor Parker°	SEC ID N°:
33	ALAASFLLIL	29		47
223	ALASISSVPL	26		48
111	TLTGTPVHQL	26		49
209	ALLTTGAFAL	25	458,437	50
23	PLLIVILVFL	25		51
272	YVRPSALRTL	24		52
261	LFLGGAVVSL	24		53
226	SISSVPLCPL	24		54
58	LLSLFIGAEI	24		55
191	WLLSNVLLST	23	291,726	56
61	LFIGAEIVAV	23		57
31	FLALAASFFLL	23	569,949	58
16	HAAGFSVPLL	23		59
269	SLQYVRPSAL	22		60
258	VLCLFLGGAV	22		61
252	VTLATGVLCL	22		62
101	LLVGLEGINI	22		63
25	LIVILVFLAL	22		64
24	LLIVILVFLA	22	112,664	65
298	LILGDPLHKQ	21		66
183	TLWVAFCFWL	21	21493,226	67
149	GLPDPVLYLA	21		68
145	ALEKGLPDPV	21		69
96	TARVGLLVGL	21		70
72	FSAEWFVGTV	21		71
175	LAGHYASATL	20		72

ES 2 273 670 T3

148	KGLPDPVLYL	20		73
104	GLEGINITLT	20		74
52	FWLVRVLLSL	20		75
21	SVPLLIVILV	20		76
69	AVHFSAEWFV		251,039	77
° Estimación del tiempo medio de disociación de una molécula que contiene esta secuencia				

En resumen, se inmunizan ratones transgénicos con péptidos HLA-A2 adyuvados, las que sean incapaces de inducir una respuesta CD8 (como se defina por una lisis eficaz de células de bazo autólogas pulsadas con el péptido) se analizarán adicionalmente en el sistema humano.

Se pulsarán células dendríticas humanas (cultivadas de acuerdo con Romani y col.) con péptidos y se usarán para estimular células T de tipo CD8 (de Facs). Después de varias estimulaciones semanales, se analizarán primero las líneas de CD8 en BLCL autólogas pulsadas con el péptido (líneas celulares transformadas con EBV-B). Para verificar el procesamiento *in vivo* apropiado del péptido, las líneas de CD8 se analizarán en células tumorales transfectadas con ADNc (células tumorales LnCap transfectada con HLA-A2, Skov3 o CAMA).

Enfoque basado en el gen completo

Se prepararon y estimularon líneas de células T CD8+ con células dendríticas transfectadas con el acelerador de partículas, fibroblastos transfectados con B7.1 traducido de forma retroviral, pox virus recombinante (Kim y col.) o células dendríticas infectadas con adenovirus (Butterfield y col.). Las células infectadas con virus son muy eficaces para presentar péptidos antigénicos ya que el antígeno se expresa a nivel alto pero sólo pueden usarse una vez para evitar el sobre-crecimiento de líneas de células T víricas.

Después de estimulaciones alternadas, las líneas de CD8+ se analizan en células tumorales transfectadas con ADNc como se ha indicado anteriormente. Se determina la especificidad e identidad del péptido para confirmar la validación inmunológica.

Referencias

Vitiello y col. (L. **Sherman**), *J. Exp. Med.*, *J. Exp. Med.*, 1991, 173:1007-1015.

Romani y col., *J. Exp. Med.*, 1994, 180:83-93.

Kim y col., *J. Immunother.*, 1997, 20:276-286.

Butterfield y col., *J. Immunol.*, 1998, 161:5607-5613.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende una cantidad eficaz de células presentadoras de antígeno, modificadas por carga *in vitro* con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2, o modificadas genéticamente *in vitro* para expresar dicho polipéptido, y un vehículo farmacéuticamente eficaz.
- 10 2. Una vacuna que comprende una cantidad eficaz de células presentadoras de antígeno, modificadas por carga *in vitro* con un fragmento inmunogénico de un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2, y en la que dicho fragmento inmunogénico es capaz de provocar una respuesta inmune que reconoce la SEC ID N°: 2, o modificadas genéticamente *in vitro* para expresar dicho fragmento inmunogénico, y un vehículo farmacéuticamente eficaz.
- 15 3. Uso de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de colon.
- 20 4. Uso de un fragmento inmunogénico de un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2, y en la que dicho fragmento inmunogénico es capaz de provocar una respuesta inmune que reconoce la SEC ID N°: 2, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de colon.
- 25 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que dicho polipéptido es parte de una proteína de fusión grande.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que dicho polipéptido está conjugado químicamente con una proteína vehículo.
- 30 7. Uso de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2, o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho polinucleótido, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de colon.
- 35 8. Uso de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70% de identidad con la de la SEC ID N°: 1 en toda la longitud de la SEC ID N°: 1, o un nucleótido complementario a dicho polinucleótido, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de colon.
- 40 9. Uso de una célula inmune en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de colon, en el que dicha célula inmune se incuba *in vitro* con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2, o un polinucleótido, comprendiendo dicho polinucleótido una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70% de identidad con la de la SEC ID N°: 1 en toda la longitud de la SEC ID N°: 1.
- 45 10. Uso de una célula inmune en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de colon, en el que dicha célula inmune se incuba *in vitro* con un fragmento inmunogénico de un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2 y en el que dicho fragmento inmunogénico es capaz de provocar una respuesta inmune que reconoce la SEC ID N°: 2.
- 50 11. Un procedimiento para diagnosticar el cáncer de colon en un sujeto, que comprende analizar la presencia o cantidad de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2 en una muestra derivada de dicho sujeto.
- 55 12. Un procedimiento para diagnosticar el cáncer de colon en un sujeto, que comprende analizar la presencia o cantidad de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70% de identidad con la de la SEC ID N°: 1 en toda la longitud de la SEC ID N°: 1; o un nucleótido complementario de dicho polinucleótido en una muestra procedente de dicho sujeto.
- 60 13. Uso de un anticuerpo inmuno específico para un polipéptido o un fragmento inmunológico de dicho polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en toda la longitud de la SEC ID N°: 2, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de colon.

65

Figura 1: Niveles de expresión de CASB618 en muestras normales y tumorales de colon emparejadas.

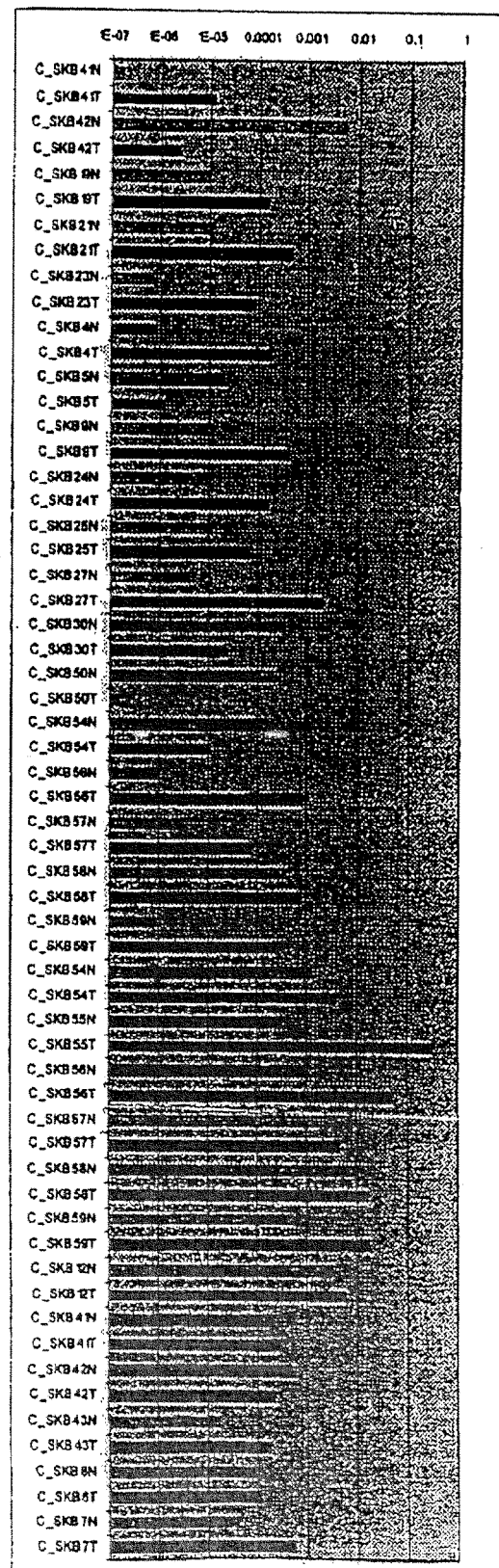


Figura 2A:Expresión de CASB618 en tejidos normales: Resultados de PCR en tiempo real

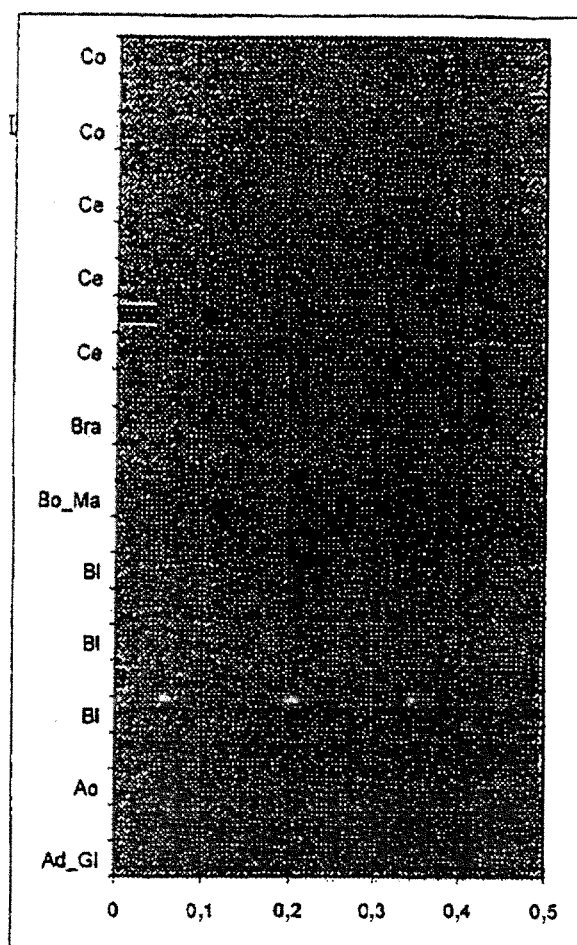


Figura 2B: Datos de PCR en tiempo real de la expresión de CASB618 en tejidos normales (continúa)

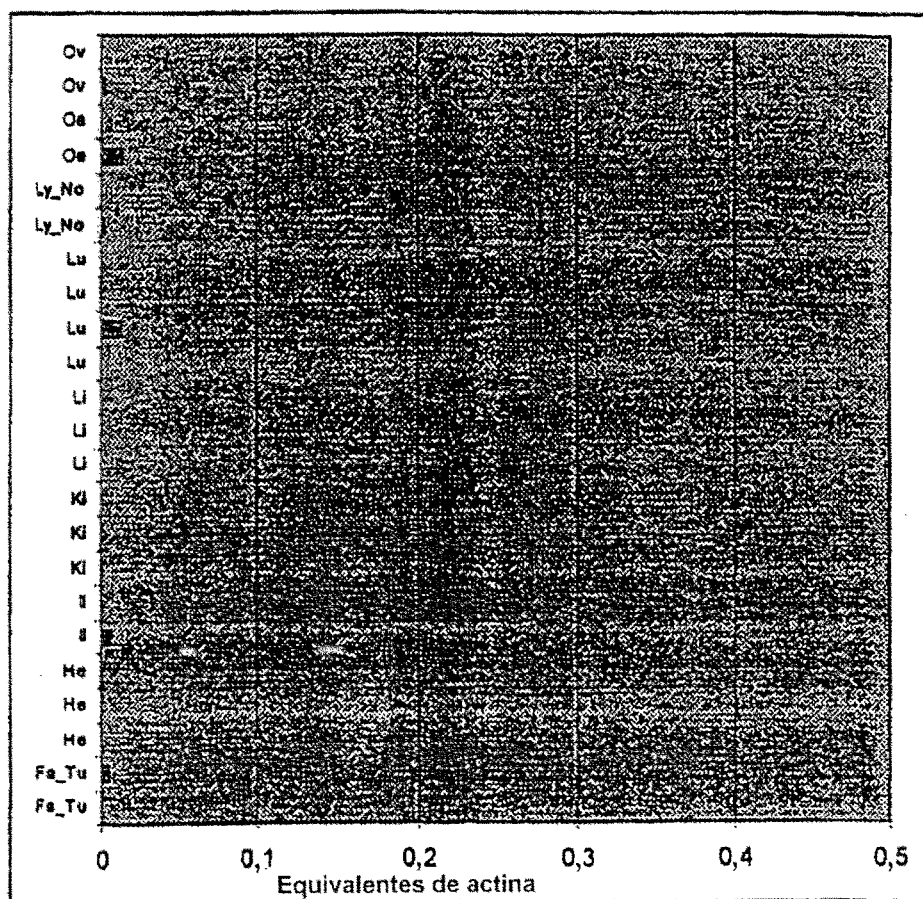


Figura 2C: Datos de PCR en tiempo real de la expresión de CASB618 en tejidos normales (continúa)

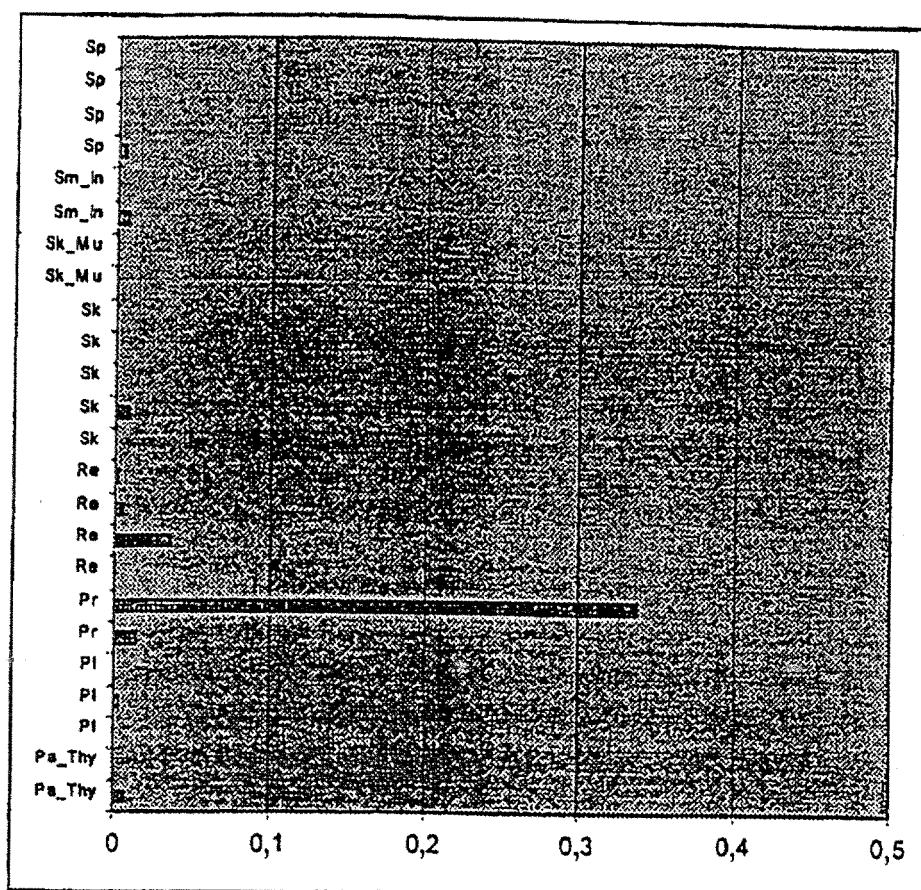


Figura 2D: Datos de PCR en tiempo real de la expresión de CASB618 en tejidos normales (continúa)

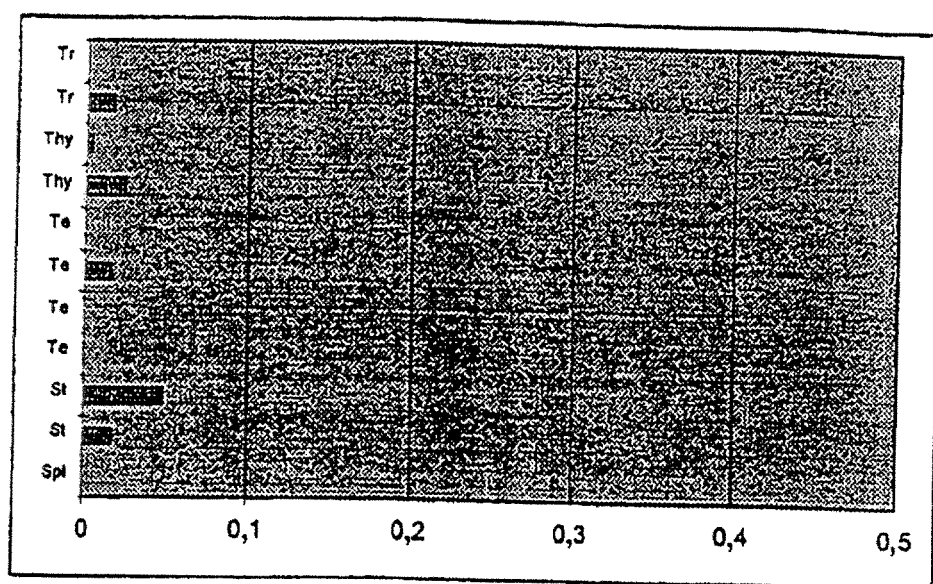


Figura 3: Gel de SDS-PAGE (12,5%) del extracto AR120/pRIT15081 de *E. coli*

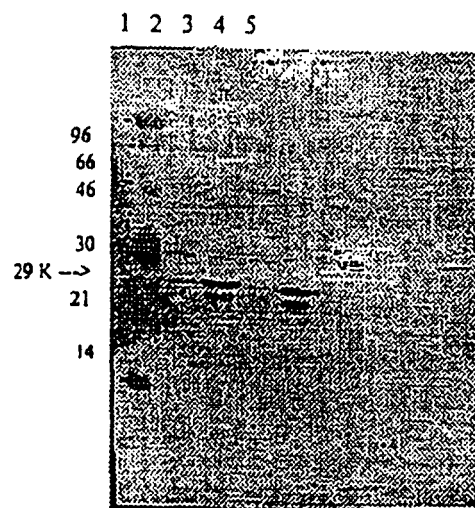
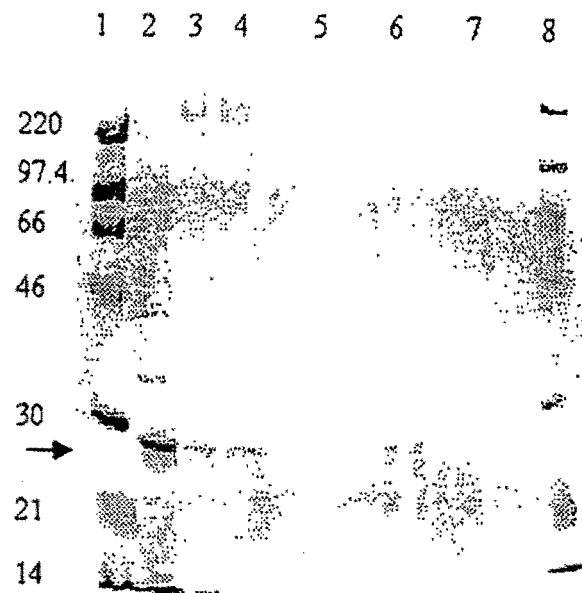
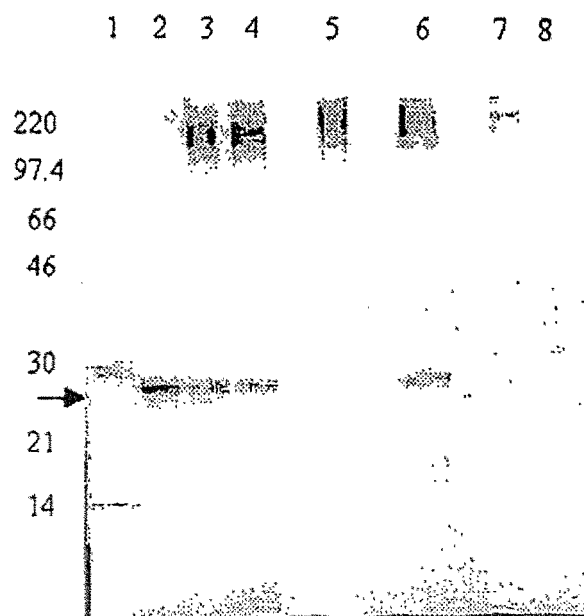


Figura 4: Geles de SDS-PAGE de CASB618 purificado



Coomasie al 12%



WB revelado con Mab anti NS1

ES 2 273 670 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Vinals-Bassols, Carlotta
Bruck, Claudine
Cassart, Jean-Pol
Coche, Thierry

<120> Nuevos compuestos

<130> BC45225

<160> 77

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1

<211> 1441

<212> ADN

<213> Ser humano

<400> 1

```

aaagtaacgg ctacagacag tgagaaatag tttcgctcgc cggctagaaa aactctgtcg      60
gtaccaaccc cagagcgttg agagcagccc acctccacgc ttccttaacg gagagggtgca    120
ggaactcagac ttcaccagcc cactcgggtcc cagccttgta cgcaaagaga cgccaaggac    180
gcgctctccc gcgtccaggc agccccagct tgctggcttg cctgcccgcc tgcgtgcagc    240
actcggcccg cgtgcagcat gacctgtgg aaaggcgtac tgccttttta cccccagccc    300
cggcatgccg caggcttcag cgttccactg ctcatcgtaa ttctagtgtt tttggctcta    360
gcagcaagct tcttgctcat cttgccgggg atccgtggcc actcgcgctg gttttggttg    420
gtgagagttc ttctcagtct gttcataggc gcagaaattg tggctgtgca cttcagtga    480
gaatggttcg tgggtacagt gaacaccaac acatcctaca aagccttcag cgcagcgcgc    540
gttacagccc gtgtcgggtc gctcgtgggc ctggagggca ttaataattac actcacaggg    600
acccacagtgc atcagctgaa cgagaccatt gactacaacg agcagttcac ctggcgtctg    660
aaagagaatt acgcgcgcgg gtaacggaac gcaactggag aggggctgcc ggacccagtg    720
ctctacctgg cggagaagt caccaccagt agcccttgcc gctgtacca ccagtaccac    780
ctggcggggac actacgcctc ggccacgcta tgggtggcgt tctgcttctg gctcctctcc    840
aacgtgctgc tctccacgcc ggccccgctc tacggaggcc tggcactgct gaccacccga    900
gccttcgcgc tcttcggggg cttcgccctg gcctccatct ctacgtgcc gctctgcccg    960
ctccgcctag gctcctccgc gctcaccact cagtacggcg ccgccttctg ggtcacgctg   1020
gcaaccggcg tctctgtgct cttcctcgga ggggccgtgg tgaagtctcca gtatgttcgg   1080
cccagcgtc ttgcacccet tctggaccaa agcgcgaagg actgcagcca ggagagaggg   1140
ggctcacctc ttatcctcgg cgacccactg cacaagcagg ccgctctccc agacttaaaa   1200
tgtatcacca ctaacctgtg agggggaccc aatctggact ccttccccgc ctggggacat   1260
cgcaggccgg gaagcagtgc ccgcccaggc tgggccaggg gagctcccgg aaggggactg   1320
agcgctgctg gcgcgaggcc tcggacatcc gcaggcacca gggaaaagtct cctggggcga   1380
tctgtaaaata aacctttttt tcttttggtt ttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa   1440
a

```

<210> 2

<211> 320

<212> PRT

<213> Ser humano

ES 2 273 670 T3

<400> 2

```

5      Met Thr Leu Trp Asn Gly Val Leu Pro Phe Tyr Pro Gln Pro Arg His
      1          5          10          15
      Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu

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

```

<210> 3

55 <211> 498

<212> ADN

<213> Ser humano

60

65

ES 2 273 670 T3

<400> 3

```

5      ctctagcgtg ccgctctgcc cgetcccgcc taggtctctc cgcgctcacc actcagtacg      60
      agcgccgcct tctgggtcac gctggcaacc ggcgtctctgt gcctcttctt cggagggggcc      120
      gtgggtgagtc tccagtatgt tggggccagc gctcttcgca ccctctctgga ccaaagcgcc      180
      aaggactgca gccaggaagag aggggggtca cctcttatcc tggcgaccc actgcacaag      240
      caggccgctc tcccagactt aaaatgtatc accactaacc tgtgaggggg acccaatctg      300
      gactccttcc ccgccttggg acatcgcagg ccgggaagca gtgcccgcca ggccctgggc      360
10     aggagagctc caggaagggc actgagcgct gctggcgcgga ggcctcgga acgcgcaggc      420
      accagggaaa gtctcctggg gcgatctgta aataaacctt tttttctttt gttttttaaa      480
      aaaaaataaa agtcgacc

```

15 <210> 4

<211> 262

<212> PRT

20 <213> Ser humano

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 9

60 <212> PRT

<213> Ser humano

<400> 5

```

65     Phe Leu Gly Gly Ala Val Val Ser Leu
      1      5

```

ES 2 273 670 T3

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Ser humano

 <400> 6

 10 Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu
 1 5

 <210> 7
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 20 <400> 7

 Thr Leu Ala Thr Gly Val Leu Cys Leu
 1 5

 25 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Ser humano

 <400> 8

 Pro Leu Tyr Gly Gly Leu Ala Leu Leu
 1 5

 35 <210> 9
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Ser humano

 45 <400> 9

 Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu
 1 5

 50 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Ser humano

 <400> 10

 Gly Leu Leu Val Gly Leu Glu Gly Ile
 1 5
 60

 <210> 11
 <211> 9
 65 <212> PRT
 <213> Ser humano

ES 2 273 670 T3

<400> 11

Trp Leu Val Arg Val Leu Leu Ser Leu
1 5

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Ser humano

<400> 12

15

Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val Ala Val
1 5

<210> 13

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Ser humano

25

<400> 13

Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val Val
1 5

30

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

35

<213> Ser humano

<400> 14

40

Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Pro Leu
1 5

<210> 15

45

<211> 9

<212> PRT

<213> Ser humano

50

<400> 15

Ser Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val
1 5

55

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

60

<213> Ser humano

<400> 16

65

Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala Leu
1 5

ES 2 273 670 T3

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Ser humano

 <400> 17

 10 Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile Thr Leu
 1 5

 <210> 18
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 20 <400> 18

 Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile Leu
 1 5

 25 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Ser humano

 <400> 19

 Phe Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ser Val
 35 1 5

 <210> 20
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Ser humano

 <400> 20
 45
 Phe Ala Leu Phe Gly Val Phe Ala Leu
 1 5

 50 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ser humano
 55
 <400> 21

 Leu Leu Ser Asn Val Leu Leu Ser Thr
 60 1 5

 <210> 22
 <211> 9
 65 <212> PRT
 <213> Ser humano

ES 2 273 670 T3

<400> 22

Tyr Ala Ala Glu Tyr Ala Asn Ala Leu
1 5

5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Ser humano

<400> 23

15

Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile
1 5

<210> 24

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Ser humano

25

<400> 24

Phe Leu Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu
1 5

30

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

35

<213> Ser humano

<400> 25

40

Ser Val Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu
1 5

<210> 26

45

<211> 9

<212> PRT

<213> Ser humano

50

<400> 26

His Leu Ala Gly His Tyr Ala Ser Ala
1 5

55

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

60

<213> Ser humano

<400> 27

65

Leu Thr Gly Thr Pro Val His Gln Leu
1 5

ES 2 273 670 T3

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Ser humano

 <400> 28
 10 Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Gly Leu
 1 5

 <210> 29
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 20 <400> 29
 Ser Ala Ala Arg Val Thr Ala Arg Val
 1 5

 25 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Ser humano

 <400> 30
 Ser Ala Glu Trp Phe Val Gly Thr Val
 35 1 5

 <210> 31
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Ser humano

 <400> 31
 45 Ala Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu Ala
 1 5

 50 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Ser humano

 <400> 32
 Ala Ala Leu Pro Asp Leu Lys Cys Ile
 60 1 5

 <210> 33
 <211> 9
 65 <212> PRT
 <213> Ser humano

ES 2 273 670 T3

<400> 33

Ile Leu Gly Asp Pro Leu His Lys Gln
1 5

5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Ser humano

<400> 34

15

Val Leu Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala
1 5

<210> 35

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Ser humano

25

<400> 35

Ala Leu Phe Gly Val Phe Ala Leu Ala
1 5

30

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

35

<213> Ser humano

<400> 36

40

Gly Leu ALa Leu Leu Thr Thr Gly Ala
1 5

<210> 37

45

<211> 9

<212> PRT

<213> Ser humano

50

<400> 37

Leu Ile Leu Pro Gly Ile Arg Gly His
1 5

55

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

60

<213> Ser humano

<400> 38

65

His Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu
1 5

ES 2 273 670 T3

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Ser humano

 <400> 39
 10 Asp Leu Lys Cys Ile Thr Thr Asn Leu
 1 5

 <210> 40
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 20 <400> 40
 Pro Leu Arg Leu Gly Ser Ser Ala Leu
 1 5

 25 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Ser humano

 <400> 41
 Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala
 1 5
 35

 <210> 42
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Ser humano

 <400> 42
 45 Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu
 1 5

 50 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ser humano
 55

 <400> 43
 Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu Leu
 1 5
 60

 <210> 44
 <211> 9
 65 <212> PRT
 <213> Ser humano

ES 2 273 670 T3

<400> 44

Val Leu Tyr Leu Ala Glu Lys Phe Thr
1 5

5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Ser humano

<400> 45

15

Thr Gln Tyr Gly Ala Ala Phe Trp Trp
1 5

<210> 46

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Ser humano

25

<400> 46

Trp Val Ala Phe Cys Phe Trp Leu Leu
1 5

30

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

35

<213> Ser humano

<400> 47

40

Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile Leu
1 5 10

<210> 48

45

<211> 10

<212> PRT

<213> Ser humano

50

<400> 48

Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ser Val Pro Leu
1 5 10

55

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

60

<213> Ser humano

<400> 49

65

Thr Leu Thr Gly Thr Pro Val His Gln Leu
1 5 10

ES 2 273 670 T3

<210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Ser humano

 <400> 50

 10 Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala Leu
 1 5 10

 <210> 51
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 20 <400> 51

 Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu
 1 5 10

 25 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Ser humano

 <400> 52

 Tyr Val Arg Pro Ser Ala Leu Arg Thr Leu
 35 1 5 10

 <210> 53
 40 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 45 <400> 53

 Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val Val Ser Leu
 1 5 10

 50 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Ser humano

 <400> 54

 Ser Ile Ser Ser Val Pro Leu Cys Pro Leu
 60 1 5 10

 <210> 55
 <211> 10
 65 <212> PRT
 <213> Ser humano

ES 2 273 670 T3

<400> 55

Leu Leu Ser Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile
1 5 10

5

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

10

<213> Ser humano

<400> 56

15

Trp Leu Leu Ser Asn Val Leu Leu Ser Thr
1 5 10

<210> 57

20

<211> 10

<212> PRT

<213> Ser humano

25

<400> 57

Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val Ala Val
1 5 10

30

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

35

<213> Ser humano

<400> 58

40

Phe Leu Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu
1 5 10

<210> 59

45

<211> 10

<212> PRT

<213> Ser humano

50

<400> 59

His Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu Leu
1 5 10

55

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

60

<213> Ser humano

<400> 60

65

Ser Leu Gln Tyr Val Arg Pro Ser Ala Leu
1 5 10

ES 2 273 670 T3

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Ser humano

 <400> 61
 10 Val Leu Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val
 1 5 10

 <210> 62
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 20 <400> 62
 Val Thr Leu Ala Thr Gly Val Leu Cys Leu
 1 5 10

 25 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Ser humano

 <400> 63
 35 Leu Leu Val Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile
 1 5 10

 <210> 64
 40 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 45 <400> 64
 Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu
 1 5 10

 50 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Ser humano

 <400> 65
 60 Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala
 1 5 10

 <210> 66
 <211> 10
 65 <212> PRT
 <213> Ser humano

ES 2 273 670 T3

<400> 66

Leu Ile Leu Gly Asp Pro Leu His Lys Gln
1 5 10

5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

10

<213> Ser humano

<400> 67

15

Thr Leu Trp Val Ala Phe Cys Phe Trp Leu
1 5 10

<210> 68

20

<211> 10

<212> PRT

<213> Ser humano

25

<400> 68

Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu Ala
1 5 10

30

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

35

<213> Ser humano

<400> 69

40

Ala Leu Glu Lys Gly Leu Pro Asp Pro Val
1 5 10

<210> 70

45

<211> 10

<212> PRT

<213> Ser humano

50

<400> 70

Thr Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Gly Leu
1 5 10

55

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

60

<213> Ser humano

<400> 71

65

Phe Ser Ala Glu Trp Phe Val Gly Thr Val
1 5 10

ES 2 273 670 T3

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Ser humano

 <400> 72
 10 Leu Ala Gly His Tyr Ala Ser Ala Thr Leu
 1 5 10

 <210> 73
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 20 <400> 73
 Lys Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu
 1 5 10

 25 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Ser humano

 <400> 74
 35 Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile Thr Leu Thr
 1 5 10

 <210> 75
 40 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Ser humano

 45 <400> 75
 Phe Trp Leu Val Arg Val Leu Leu Ser Leu
 1 5 10

 50 <210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Ser humano

 <400> 76
 60 Ser Val Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu Val
 1 5 10

 <210> 77
 <211> 10
 65 <212> PRT
 <213> Ser humano

ES 2 273 670 T3

<400> 77

Ala Val His Phe Ser Ala Glu Trp Phe Val
1 5 10

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65