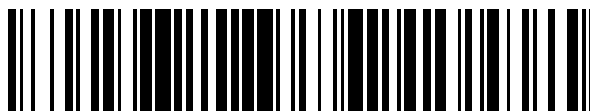


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 413**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2000 E 00940803 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1186890**

54 Título: **Kit de detección de SRSV**

30 Prioridad:

22.06.1999 JP 17592899

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

19.03.2013

73 Titular/es:

**JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR-
GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF
INFECTIOUS DISEASES (50.0%)
1-23-1 Toyama 1-chome, Shinjuku-ku
Tokyo 162-0052, JP y
DENKA SEIKEN CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAKEDA, NAOKAZU;
NATORI, KATSURO;
MIYAMURA, TATSUO;
KAMATA, KUNIO;
SATO, TOSHINORI y
SATO, SEIYA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 398 413 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Kit de detección de SRSV

5 **Campo Técnico**

Esta invención se refiere a un kit para detectar y distinguir uno o más virus pequeños de estructura redonda (denominados en adelante "SRSV" por sus siglas en inglés) en un espécimen.

10 **Técnica Anterior**

Los SRSV son un grupo de virus causantes de la gastroenteritis viral humana, remontándose el descubrimiento del primero de los mismos a 1972. Son conocidos por causar la gastroenteritis aguda infantil y también brotes de intoxicaciones alimentarias o similares entre adultos y niños de preescolar o de escuela primaria. Debido a la incapacidad para hacer proliferar estos SRSV mediante cultivo celular y a la carencia de modelos animales capaces de mostrar sensibilidad a los mismos, apenas se encuentran disponibles antígenos de SRSV y anticuerpos anti-SRSV, dando como resultado un retraso en el desarrollo de métodos inmunoserológicos para la detección de los virus.

20 En tales circunstancias, se logró clonar con éxito el gen del virus de Norwalk, un SRSV, en 1993, conduciendo a la determinación de la secuencia de bases de su genoma completo [Patente Japonesa (PCT) 6-506823 A]. Con posterioridad, se desarrollaron métodos de PCR que son útiles para amplificar una parte de una región de ARN polimerasa, y hasta la fecha se han encontrado 14 virus relacionados con SRSV. Como resultado de los análisis de aproximadamente 120 aminoácidos en estas regiones de las ARN polimerasa, se considera que los SRSV están diferenciados *grosso modo* en dos genogrupos, esto es, el Genogrupo I que incluye la cepa del virus de Norwalk como prototipo y el Genogrupo II que incluye la cepa del Virus Snow Mountain como prototipo.

30 A medida que se desarrollaron análisis genéticos de virus relacionados con SRSV, se tuvo conocimiento de que existía una diversidad sustancial incluso en el mismo genogrupo. Por otra parte, se encontró que con un método de RT-PCR que hacía uso de cebadores para los genes de las cepas de virus de Norwalk y de virus Snow Mountain como prototipos de los respectivos genogrupos, ninguno de los SRSV es detectable y también que es muy difícil diseñar cebadores o ajustar las condiciones de la RT-PCT para lograr una amplificación eficaz de los SRSV.

35 Mientras tanto, se prepararon antígenos contra algunos de los virus, tales como la cepa del virus de Norwalk y la cepa del virus Snow Mountain, mediante expresión genética, se obtuvieron anticuerpos, y también se desarrollaron métodos de detección de SRSV dependientes de ELISA haciendo uso de tales anticuerpos. No obstante, todavía fue imposible detectar ninguno de los SRSV causantes de la gastroenteritis debido a la diversidad de los SRSV.

40 En Japón, por otra parte, en 1997 se determinó que los SRSV eran los factores causantes de las intoxicaciones alimentarias tal como se definieron en el Food Sanitation Act de manera que, si se desencadena una intoxicación alimentaria por SRSV, se requiere la determinación de su ruta de infección. Por consiguiente se desea un método que detecte fácilmente y de manera segura e identifique los SRSV en las heces de un sujeto o en los alimentos.

45 El documento de HALE A et al, "Expression and self-assembly of grimsby virus: Antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses" CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, vol. 6, núm. 1, Enero 1999, páginas 142-145 describe la secuencia que codifica la proteína de la cápsida de GRV, su uso en la preparación de VLP de GRV, el uso de estas últimas para preparar antisuero hiperinmunitario anti-GRV, y la especificidad del serotipo de dichos antisueros hiperinmunitarios anti-GRV, anti-MXV y anti-NV (véase p. ej. la Tabla 2).

50 **Descripción de la Invención**

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un kit que puede detectar fácilmente de un espécimen un virus relacionado con SRSV conocido hasta la fecha y pueda discriminar de manera segura su serotipo y genogrupo.

55 A la vista de las circunstancias anteriores, los autores de la presente invención han continuado con una investigación genética e inmunológica sobre los virus relacionados con SRSV. Como resultado, se ha encontrado que el uso combinado de anticuerpos obtenidos a partir de péptidos de virus relacionados con SRSV, incluyendo péptidos de virus novedosos encontrados recientemente, puede detectar la mayor parte de los SRSV en los especímenes y pueden discriminar de manera segura los Serotipos y los genogrupos de los SRSV, conduciendo a la realización de la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona:

1. Un kit de detección de SRSV que consiste esencialmente en:
 - (a) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 1 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 1, y
 - 5 (b) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 2, y
 - (c) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 3 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 3, y
 - 10 (d) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 4, y
 - (e) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 5 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 5, y
 - 15 (f) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 6 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 6, y
 - (g) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 7 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 7, y
 - (h) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 8 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 8, y
 - 20 (i) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 9 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 9, y
 - (j) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 10 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 10, y
 - 25 (k) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 11 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 11.
2. Un kit de detección de SRSV de acuerdo con el apartado 1, en donde dichos anticuerpos han sido preparados mediante inmunización con partículas de tipo virus.
3. Un kit de detección de SRSV de acuerdo con el apartado 1, para distinguir los serotipos de los SRSV.
4. Un kit de detección de SRSV para discriminar el genogrupo de los SRSV, consistiendo el kit esencialmente en
 - 35 (a) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 1 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 1, y
 - (b) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 2, y
 - 40 (c) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 3 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 3, y
 - (d) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 4.
 - 45
5. Un kit de detección de SRSV para discriminar el genogrupo de los SRSV, consistiendo el kit esencialmente en
 - (e) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 5 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 5, y
 - 50 (f) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 6 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 6, y
 - (g) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 7 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 7, y
 - 55 (h) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 8 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 8, y
 - 60 (i) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO:

- 9 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 9, y
 (j) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 10 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 10, y
 5 (k) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 11 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 11.
6. Un kit de detección de SRSV de acuerdo con los apartados 1 a 5, en donde los anticuerpos están inmovilizados sobre portadores de anticuerpos en fase sólida adecuados para capturar SRSV.
7. Un gen de Hu/NLV/Chiba/407/1987/JP que tiene
 (a) una secuencia de bases representada por el SEQ ID NO: 15; o
 (b) una secuencia de bases que codifica un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 4.
- 15 8. Un gen de Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP que tiene
 (a) una secuencia de bases representada por el SEQ ID NO: 20; o
 (b) una secuencia de bases que codifica un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 9.
- 20 9. Un gen de Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP que tiene
 (a) una secuencia de bases representada por el SEQ ID NO: 21; o
 (b) una secuencia de bases que codifica un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 10.
- 25 10. Un gen de Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP que tiene
 (a) una secuencia de bases representada por el SEQ ID NO: 22; o
 (b) una secuencia de bases que codifica un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 11.
11. Un anticuerpo anti-SRSV específico para partículas de tipo virus que consisten en el péptido del SEQ ID NO: 4, el SEQ ID NO: 9, el SEQ ID NO: 10 o el SEQ ID NO: 11.

30 Breve Descripción de los Dibujos

- La FIG. 1 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Seto 124/1989/JP.
- 35 La FIG. 2 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP.
- La FIG. 3 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP.
- La FIG. 4 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Narita 104/1997/JP.
- 40 La FIG. 5 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP.
- La FIG. 6 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP.
- 45 La FIG. 7 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP.
- La FIG. 8 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP.
- La FIG. 9 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP.
- 50 La FIG. 10 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP.
- La FIG. 11 es una micrografía electrónica (x 100.00) de partículas de tipo virus derivadas de la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP.

55 Mejores Modos de Llevar a Cabo la Invención

1. Virus relacionados con SRSV

60 El kit de detección de SRSV de acuerdo con la presente invención se caracteriza por el uso de anticuerpos contra los péptidos que constituyen los virus relacionados con SRSV que tienen las 11 secuencias de aminoácidos específicas o al menos 80% de homologías con las secuencias de aminoácidos de los grupos (a) a (k). De estos, los péptidos pertenecientes al grupo (d), al grupo (i), al grupo (j) y al grupo (k) son péptidos novedosos diferentes de cualquiera de los virus relacionados con SRSV registrados en el GeneBank hasta la fecha (Tabla 1, que se describirán con posterioridad en la presente memoria). Debido a la incorporación de los 11 anticuerpos, incluyendo

los anticuerpos contra estos péptidos novedosos, en el kit, se pueden detectar sin omisión los virus relacionados con SRSV.

5 Los péptidos que constituyen los virus relacionados con SRSV útiles en la presente invención abarcan sus mutantes en cada uno de los cuales se han suprimido, remplazado o añadido uno o más aminoácidos de su secuencia de aminoácidos correspondiente; y también sus mutantes en cada uno de los cuales se han suprimido, remplazado o añadido una o varias bases a una secuencia de bases que codifica su correspondiente secuencia de aminoácidos.

10 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 1 en el grupo (a) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón, mientras los ejemplos de los péptidos que tienen cada uno una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos humana incluyen uno derivado de la cepa Desert Shield/90/SA (Núm. de Acceso Genebank U04469).

15 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 en el grupo (b) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Seto 124/1989/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón, mientras los ejemplos de los péptidos que tienen cada uno una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos incluyen aquellos derivados de la cepa KY-89/89J (Núm. de Acceso Genebank L23828) y la cepa Norwalk/68/US (Núm. de Acceso Genebank M876611).

20 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 3 en el grupo (c) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón, mientras los ejemplos de los péptidos que tienen cada uno una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos incluyen uno derivado de la cepa Southampton/91/UK (Núm. de Acceso Genebank L07418).

25 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 4 en el grupo (d) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón.

30 El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 4 tiene una homología de menos de 75% en el gen estructural (SEQ ID NO: 15) con cualquiera de las cepas de virus relacionados con SRSV (Tabla 1, que se describirán con posterioridad en la presente memoria) registrados en el GeneBank hasta la fecha, y es un péptido que tiene una secuencia novedosa no referida hasta la fecha hasta la fecha.

35 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 5 en el grupo (e) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Narita 104/1997/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón, mientras los ejemplos de los péptidos que tienen cada uno una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos incluyen aquellos derivados de la cepa Bristol/93/UK (Núm. de Acceso Genebank X76716), la cepa Lordsdale/93/UK (Núm. de Acceso Genebank X86557), y la cepa Camberwell/94/AU (Núm. de Acceso Genebank U46500).

45 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 6 en el grupo (f) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón, mientras los ejemplos de los péptidos que tienen cada uno una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos incluyen aquellos derivados de la cepa Mexico/89/MEX (Núm. de Acceso Genebank U22498), la cepa Auckland (Núm. de Acceso Genebank U460391), la cepa Toronto/77/CA (Núm. de Acceso Genebank U02030), y la cepa OTH-25/89/J (Núm. de Acceso Genebank L23830).

50 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 7 en el grupo (g) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón, mientras los ejemplos de los péptidos que tienen cada uno una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos incluyen aquellos derivados de la cepa Snow Mountain/76/US (Núm. de Acceso Genebank U70059) y la cepa Melksham/89/UK (Núm. de Acceso Genebank X81879).

55 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 8 en el grupo (h) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón, mientras los ejemplos de los péptidos que tienen cada uno una homología de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos incluyen uno derivado de la cepa Hawaii/71/US (Núm. de Acceso Genebank U07611).

60 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 9 en el grupo (i) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón.

El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 9 tiene una homología de menos de 75% en el gen estructural (SEQ ID NO: 20) con una cualquiera de las cepas de virus relacionados con SRSV (Tabla 1, que se describirán con posterioridad en la presente memoria) registrados en el GeneBank hasta la fecha, y es un péptido que tiene una secuencia novedosa no referida hasta la fecha.

5 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 10 en el grupo (j) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón.

10 El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 10 tiene una homología de secuencia de menos de 70% en el gen estructural (SEQ ID NO: 21) con una cualquiera de las cepas de virus relacionados con SRSV (Tabla 1, que se describirá con posterioridad en la presente memoria) registrados en el GeneBank hasta la fecha, y es un péptido que tiene una secuencia novedosa no referida hasta la fecha.

15 Es ilustrativo del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 11 en el grupo (k) un péptido que constituye un virus de la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP obtenido de las heces de un paciente infectado con SRSV en Japón.

20 El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 11 tiene una homología de secuencia de menos del 70% en el gen estructural (SEQ ID NO: 22) con una cualquiera de las cepas de virus relacionados con SRSV (Tabla 1, que se describirán con posterioridad en la presente memoria) registrados en el GeneBank hasta la fecha, y es un péptido que tiene una secuencia novedosa no referida hasta la fecha.

Tabla 1

Cepa de virus	Núm. de Acceso Genebank
Desert Shield/90/SA	U04469
Norwalk/68/US	M876611
KY-89/89J	L23828
OTH-25/89/J	L23830
Southampton/91/UK	L07418
Lordsdale/93/UK	X86557
Bristol/93/UK	X76716
Camberwell/94/AU	U46500
Toronto/77/CA	U02030
Mexico/89/MEX	U22498
Snow Mountain/76/US	U70059
Melksham/89/UK	X81879
Auckland	U460391
Hawaii/71/US	U07611

25 Los péptidos que constituyen virus relacionados con SRSV en estos grupos (a) a (k) incluyen, además de los péptidos anteriormente descritos, péptidos parciales que contienen cada uno una secuencia de aminoácidos específica en su correspondiente péptido y tiene una antigenicidad equivalente a la del correspondiente péptido.

30 De acuerdo con un análisis de homología de aproximadamente 120 aminoácidos de regiones de la ARN polimerasa de los péptidos que constituyen virus relacionados con SRSV, estos péptidos que constituyen virus relacionados con SRSV pueden ser clasificados en dos genogrupos. Descrito de manera específica, se pueden clasificar en el Tipo I al cual pertenecen los péptidos de los grupos (a) a (d) y el Tipo II al cual pertenecen los péptidos de los grupos (e) a (k).

2. Clonación de los genes que constituyen los virus relacionados con SRSV

40 A partir de las heces de un paciente infectado con SRSV, se extrajo ARN viral utilizando el método del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o similar, se formó el ADNc por medio de un cebador de oligo-dT y una transcriptasa

inversa, y utilizando el ADNc y cebadores capaces de amplificar regiones del gen estructural de los virus asociados con SRSV individuales, se llevó a cabo la PCR para amplificar los fragmentos génicos estructurales.

5 Dicho fragmento génico estructural se inserta en un plásmido llevando a cabo una vez una clonación TA con un vector de clonación de *E. coli*.

10 En cuanto al vector de clonación utilizable aquí, es posible utilizar un vector de clonación conocido tal como un vector derivado de un plásmido obtenido utilizando como anfitrión células procarióticas representadas por *E. coli* o a partir de un bacteriófago representado por el fago ϕ , y se desea utilizar de manera apropiadamente combinada un vector de clonación y su célula anfitriona. Los ejemplos específicos del vector de clonación incluyen pBR322, pUC19 y pCRII. La inserción del ADN se puede llevar a cabo mediante un método conocido *per se* en la técnica, y tras la formación de dicho vector, se desea utilizar células de *E. coli* ya que permiten una fácil manipulación genética.

15 3. Expresión del gen estructural y creación de partículas de tipo virus.

Al disponer de los fragmentos de los genes que constituyen el virus individual obtenido anteriormente de los grupos (a) a (k) expresados con un sistema de expresión adecuado o al utilizar partículas de tipo virus creadas a partir de los péptidos que constituyen el virus mediante ingeniería genética, se pueden obtener anticuerpos contra los respectivos virus. A continuación se realizará una descripción sobre la expresión en la que se utiliza *E. coli* y también sobre la creación de las partículas de tipo virus.

20 (1) Expresión por *E. coli*

25 Cada uno de los plásmidos con las regiones génicas estructurales de los respectivos virus relacionados con SRSV incorporados en ellas, es digerido con una endonucleasa de restricción que no escinde la región del gen estructural. Después, se recoge la región del gen estructural y se incorpora, por ejemplo, en pGEX (vector de expresión de la proteína de fusión GST; producto de Pharmacia AB), pTrc99A (vector de expresión de *E. coli*; producto de Pharmacia AB), pTrxFus (vector de expresión de proteína de fusión de tiorredoxina; producto de Invitrogen Corporation), pET (vector de expresión que hace uso del promotor pT7RNA; producto de Novagen Inc.), un vector de expresión de proteína de unión a maltosa, o un vector de expresión de proteína de fusión a galactosidasa. En este momento, la región del gen estructural que se va a incorporar puede tener toda su longitud o puede ser una región parcial, prefiriéndose que la región parcial contenga al menos un epítipo antigénico de un SRSV. Los vectores de expresión génica con las regiones del gen estructural incorporadas como se ha descrito más arriba son transformados mediante una cepa de *E. coli* adaptada para la expresión del gen, por ejemplo, la cepa BL21, la cepa DH10B, la cepa JM109 o la cepa XL1-Blue. La expresión del gen se puede llevar a cabo cultivando los transformantes así obtenidos en un medio de cultivo líquido general, por ejemplo, caldo L. Para la expresión se prefiere añadir un promotor de la expresión del gen, por ejemplo, IPTG o, cuando se utiliza un promotor PL, aplicar un choque térmico.

40 La purificación de un péptido expresado de este modo se puede llevar a cabo siguiente un método de purificación general para proteínas expresadas, que hace uso de *E. coli*. Si la proteína expresada está en forma disuelta, por ejemplo, su purificación se puede llevar a cabo mediante cromatografía de afinidad haciendo uso de una columna de GST o una columna para proteínas de unión a maltosa. Si la proteína expresada está en una forma insoluble, su purificación se puede lograr llevando a cabo una cromatografía de afinidad haciendo uso de un quelato de Ni.

45 (2) Creación de partículas de tipo virus SRSV

50 Un plásmido con una región de un gen estructural de un virus relacionado con SRSV incorporada en el es digerido con una endonucleasa de restricción que no escinde la región del gen estructural. A continuación, la región del gen estructural se recoge y se incorpora, por ejemplo, en un vector de transferencia de baculovirus tal como pVL1393. El vector de transferencia y un ADN de baculovirus lineal, del cual se ha suprimido una región génica esencial para la proliferación, se someten a transfección en células de insecto de manera que se induce la recombinación homóloga para formar el baculovirus recombinante diana.

55 Infectando con el baculovirus recombinante así obtenido células de insecto tales como células Sf9 o células Tn5 e incubando las células de insecto infectadas en condiciones de crecimiento adecuadas de una manera conocida *per se* en la técnica, se expresa la proteína estructural de SRSV. Permitiendo que la proteína estructural experimente un auto-ensamblaje, se pueden producir partículas de tipo virus. El uso de un método de purificación bioquímico, por ejemplo, la centrifugación se hace posible aislar y purificar las partículas de tipo virus. Se puede confirmar si se han formado o no tales partículas de tipo virus sometiendo el producto auto-ensamblado a tinción negativa con acetato de uranilo y examinando el producto auto-ensamblado teñido al microscopio electrónico.

60 Las partículas de tipo virus obtenidas como se ha descrito más arriba no tienen infectividad ya que no contienen ningún gen internamente. Sin embargo, tienen una antigenicidad equivalente a la de las partículas de virus ya que

estructuralmente tienen sustancialmente la misma forma que las partículas de virus.

4. Adquisición de anticuerpos contra virus relacionados con SRSV

5 Inmunizando un animal con el péptido que constituye el virus así obtenido o con las partículas de tipo virus, se puede preparar un anticuerpo anti-virus relacionado con SRSV. Por lo demás, dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

10 La preparación de un anticuerpo inmune haciendo uso de partículas de tipo virus se puede llevar a cabo, por ejemplo, como se describirá a continuación. De una manera conocida *per se* en la técnica, se inmuniza un conejo con partículas de tipo virus de uno de los virus relacionados con SRSV, y a partir del suero separado, se puede obtener un anticuerpo IgG (anticuerpo anti-SRSV) contra las partículas de tipo virus. Para la separación y aislamiento del anticuerpo, se puede utilizar un método tal como la cromatografía en DEAE Sefarosa.

15 Utilizando los 11 tipos de partículas de tipo virus de los grupos (a) a (k) obtenidos como se ha descrito anteriormente y sus correspondientes anticuerpos anti-SRSV, se midieron sus reactividades cruzadas. Como se mostrará más abajo en la Tabla 2, no se mostró absolutamente ninguna reactividad cruzada entre los virus relacionados con SRSV individuales. De acuerdo con el método de detección de SRSV de la presente invención, es posible por lo tanto discriminar simultáneamente los serotipos de los 11 tipos de SRSV. Esto también indica la posibilidad de discriminar el Genogrupo I y el Genogrupo II entre sí al mismo tiempo.

5. Detección de virus relacionados con SRSV

25 Para la detección de uno o más SRSV en un espécimen por los anticuerpos anti-SRSV individuales obtenidos como se ha descrito, se pueden utilizar inmunoanálisis empleados convencionalmente que hacen uso de reacciones antígeno-anticuerpo, por ejemplo, radioinmunoanálisis mediante la técnica sándwich, análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) y similares, siendo particularmente preferido ELISA. Descrito específicamente, los 11 tipos de anticuerpos anti-SRSV se vierten por separado en una microplaca para preparar una placa de escrutinio de SRSV. Una dilución de una emulsión fecal, que se ha preparado a partir de heces de un paciente infectado con SRSV, se añade a los pocillos de la placa, y después se deja que reaccione. Después de eso se añaden los anticuerpos-anti-SRSV marcados con peroxidasa (POD) de los respectivos virus y se dejan reaccionar. Después de añadir una solución de sustrato (TMB que contiene peróxido de hidrógeno) y dejar que reaccione, se añade ácido sulfúrico 0,6 N para detener las reacciones. Midiendo la absorbancia (450 nm/630 nm) de cada pocillo por medio de un lector de placa automático para ELISA, se puede detectar el SRSV o los SRSV.

35 Cuando se desea llevar a cabo solamente la detección de uno o más SRSV en un espécimen, se puede preparar un kit de detección utilizando una microplaca con los 11 tipos de anticuerpos anti-SRSV mezclados e inmovilizados en ella. Para discriminar también los serotipos de los uno o más SRSV, se puede preparar un kit de detección utilizando microplacas con los 11 tipos de anticuerpos anti-SRSV inmovilizados por separado sobre ellas.

40 Adicionalmente, la discriminación de los genogrupos es posible por medio de un kit que hace uso de una microplaca con anticuerpos contra los péptidos de los grupos (a) a (d) mezclados e inmovilizados sobre ella (placa con Tipo I) o una microplaca con anticuerpos contra los péptidos de los (e) a (k) mezclados e inmovilizados sobre ella (placa con Tipo II).

45 Por otra parte, la inmovilización de los anticuerpos anti-SRSV individuales útiles en la presente invención con un portador tal como látex o cuentas magnéticas hace posible capturar de manera segura uno o más virus relacionados con SRSV en un espécimen. El portador con uno o más virus asociados a SRSV capturados sobre él puede ser recuperado mediante centrifugación en el caso del látex o mediante un imán en el caso de las cuentas magnéticas. Después de la recuperación, se pueden extraer los ARN del virus y utilizarlos.

Ejemplo

55 Los kits de detección de SRSV de acuerdo con la presente invención se describirán específicamente más adelante en la presente memoria basándose en Ejemplos.

Ejemplo 1 Clonación de genes estructurales de virus relacionados con SRSV

(1) Síntesis de ADNc

60 Se añadieron PBS (9 mL) y "Daiflon" (1 mL) a heces (0,5 a 1,0 g) de un paciente con SRSV, seguido de homogeneización. El producto homogeneizado se centrifugó después a 3.000 rpm durante 20 minutos, y el sobrenadante se recogió en forma de una emulsión fecal al 10%.

Utilizando una alícuota de 1 L de la emulsión fecal, se extrajo el ARN del SRSV por medio del método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), y el ARN se suspendió eventualmente en una solución de pirocarbonato de dietilo al 0,1% (30 µL). Utilizando la suspensión, se preparó ADNc por medio de transcriptasa inversa derivada del cebador Oligo-dT(12-18) y AMV (Virus de la Mieloblastosis Aviar) (producto de SEIKAGAKU CORPORATION).

(2) Aislamiento de regiones de genes estructurales

Utilizando el ADNc preparado en el apartado (1) y cebadores para la amplificación de las regiones de genes estructurales mostradas más abajo, se llevó a cabo la PCR. Después de la PCR, se separaron los fragmentos de genes estructurales amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa, y a continuación se recuperaron utilizando "SuprecTM-01" (TAKARA).

gen Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP:G1/F2 (SEQ ID NO: 23), Oligo-dT(33) (SEQ ID NO: 24)
 gen Hu/NLV/Seto 124/1989/JP:G1/F2 (SEQ ID NO: 23), G1/R0 (SEQ ID NO: 25)
 gen Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP:G1/F2 (SEQ ID NO: 23), Oligo-dT(33) (SEQ ID NO: 24)
 gen Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP:D5 (SEQ ID NO: 26), CV-U4 (SEQ ID NO: 27)
 gen Hu/NLV/Narita104/1997/JP:97k104/F1 (SEQ ID NO: 28), 97k104/R1 (SEQ ID NO: 29)
 gen Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP:G2/F3 (SEQ ID NO: 30), MV-R1 (SEQ ID NO: 31)
 gen Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP:G2/F3 (SEQ ID NO: 30), SMV-R1 (SEQ ID NO: 32)
 gen Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP:G2/F3 (SEQ ID NO: 30), G2/R0 (SEQ ID NO: 33)
 gen Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP: 97k104/F1 (SEQ ID NO: 28), Oligo-dT(33) (SEQ ID NO: 24)
 gen Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP:G2/F3 (SEQ ID NO: 30), Oligo-dT(33) (SEQ ID NO: 24)
 gen Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP:GFCR7 (SEQ ID NO: 34), Oligo-dT(33) (SEQ ID NO: 24)

(3) Clonación de genes estructurales

Se llevó a cabo la clonación TA de los fragmentos de genes estructurales recuperados en un vector de clonación de *E. coli*, pCRII (producto de Invitrogen Corporation). A partir de estos clones se obtuvieron plásmidos con los genes estructurales de los virus incorporados, pCRII/645, pCRII/124, pCRII/258, pCRII/Chiba, pCRII/104, pCRII/809, pCRII/754, pCRII/76, pCRII/47, pCRII/7k, y pCRII/10-25.

Ejemplo 2 Determinación de las secuencias de bases

La determinación de las secuencias de bases de los genes estructurales de la cepa Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP, la cepa Hu/NLV/Seto 124/1989/JP, la cepa Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP, la cepa Hu/NLV/Narita 104/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP, y la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP se llevó a cabo de la manera descrita más abajo.

En primer lugar, se dispuso en cebador (primer cebador) en las cercanías del promotor de la polihedrina de pVL1393 como vector de transferencia, y mediante el método de terminación con colorante, se llevó a cabo una reacción de marcaje utilizando un "Cycle Sequencing Kit FS" (producto de Perkin-Elmer Corp.). La concentración de ADN del vector de transferencia empleado fue de 0,4 µg/µL, mientras que la concentración del cebador de secuenciación utilizado fue de 3,2 pmoles/µL. Después de la reacción, se eliminó el exceso de pigmento fluorescente utilizando una columna de centrifugación Centriprep (fabricada por Perkin-Elmer Corp.). La mezcla de reacción se secó completamente por medio de un liofilizador de vacío, y el producto liofilizado se suspendió en un tampón de muestra especial (20 µL; producto de Perkin-Elmer Corp.). Después de la agitación, la suspensión se sometió a precipitación centrífuga. El producto precipitado se secó a 95°C durante 2 minutos. Después de la extinción, se analizó por medio de un secuenciador automático ("ABI Genetic Analyzer 310").

Utilizando la secuencia de bases determinada por el primer cebador, se colocó un nuevo cebador de secuenciación (segundo cebador) en el lado 3' de la secuencia de bases. Utilizando este segundo cebador, se llevó a cabo una reacción de marcaje mediante un kit de secuenciación cíclica de una manera similar a la mencionada más arriba. Después de la reacción, se llevó a cabo una operación similar a la mencionada más arriba, y se analizó la secuencia de bases por medio de un secuenciador automático. Como se ha descrito más arriba, se colocó un cebador de secuenciación en el lado 3' de la secuencia de bases determinada en cada ciclo, y se realizó la determinación de la secuencia de bases. Repitiendo este procedimiento, se determinaron las secuencias de bases de los extremos 5' a los extremos 3' de los 11 tipos de genes estructurales de virus relacionados con SRSV (SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 22). Entre estas, se confirmó que las secuencias de bases representadas por el SEQ ID NO: 15 (la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP), el SEQ ID NO: 20 (la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP), el SEQ ID NO: 21 (la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP) y el SEQ ID NO: 22 (la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP) eran secuencias novedosas no referidas hasta la fecha.

Ejemplo 3 Creación de baculovirus recombinante capaz de producir partículas de tipo virus**(1) Construcción de vectores de transferencia**

5 Los plásmidos con las regiones de los genes estructurales incorporadas, que se habían obtenido en el Ejemplo 1(3), fueron digeridos por medio de una endonucleasa de restricción que no escinde las regiones de genes estructurales. Con posterioridad a la separación mediante electroforesis en gel de agarosa, se recuperaron las regiones de genes estructurales mediante "SuprecTM01" (TAKARA). Los fragmentos génicos recuperados se incorporaron a vectores de transferencia de baculovirus pVL1393 (producto de Invitrogen Corporation), que habían sido digeridos con la
10 misma endonucleasa de restricción, para preparar los vectores de transferencia.

(2) Creación de baculovirus recombinantes

15 Se disolvieron ADN de baculovirus (0,5 µg; "Baculo-Gold") y uno de los vectores de transferencia (1 µg) obtenidos en el apartado (1) en agua destilada (8 µL). La solución resultante se mezcló con una dilución 1/2 de lipofectina (cantidad equivalente), y la mezcla obtenida de este modo se dejó a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se suspendieron células Sf9 (1×10^5 células) en un medio de cultivo para células de insecto, "Ex-cell 400", se adsorbieron a 26,5°C durante 30 minutos en una placa de Petri de plástico (diámetro: 3,5 cm), se añadió gota a gota a las células una mezcla del vector de transferencia y "Baculo-Gold", seguido de incubación a 26,5°C.
20 Veinticuatro horas más tarde, el medio de cultivo se reemplazó por "TC100" (producto de GIBCO BRL Life Technologies; referido más adelante en la presente memoria como "TC100") que contenía suero bovino fetal al 10% y BTB al 2% (productos de GIBCO BRL Life Technologies), y se continuó la incubación adicionalmente.

(3) Purificación de baculovirus recombinantes

25 Después de que cada uno de los baculovirus recombinantes obtenidos en el apartado (2) fuera incubado durante 5 días, se diluyó el sobrenadante de cultivo 1/10 con un medio de cultivo para células de insecto tal como TC100. Se tomó una alícuota de 0,1 mL del sobrenadante diluido, y se inoculó en 3×10^6 células Sf9 cultivadas en una placa de Petri de plástico de 3,5 cm de diámetro. Después de una adsorción a 26,5°C durante 60 minutos, se puso encima el medio de cultivo TC100 (2 mL) que contenía 1% de Agarosa ME (agarosa de bajo punto de fusión), seguido de incubación a 26,5°C. A los cuatro días del inicio de la incubación, se añadió en la parte superior TC100 adicional (1 mL) que contenía 0,005% de rojo neutro, seguido de incubación a 26,5°C. Al día siguiente, las placas formadas se separaron raspando con una micropunta de pipeta, y se suspendieron en medio de cultivo TC100.

(4) Producción de siembras de baculovirus recombinante y medición de sus potencias infectivas

35 Cada una de las suspensiones obtenidas en el apartado (3) se inoculó a 1×10^7 células Sf9. Con posterioridad a la adsorción a 26,5°C durante 60 minutos, se añadió TC100, seguido de incubación a 26,5°C durante 3 a 4 días. El cultivo se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo recogido se inoculó a 1×10^7 células Sf9. Después de la adsorción a 26,5°C durante 60 minutos, se añadió TC100, seguido de incubación a 26,5°C durante 3 a 4 días.

45 A continuación, se inoculó el sobrenadante de cultivo a 3×10^7 células Sf9 en una placa de Petri de plástico de 3,5 cm de diámetro. Con posterioridad a la adsorción a 26,5°C durante 60 minutos, se añadió en la parte superior medio de cultivo TC100 (2 mL) que contenía 1% de Agarosa ME (agarosa de bajo punto de fusión), seguido de incubación a 26,5°C. El cuarto día después del inicio de la incubación, se añadió en la parte superior TC100 (1 mL) que contenía 0,005% de rojo neutro, seguido de incubación a 26,5°C. Al día siguiente, las placas formadas se midieron para calcular la potencia infectiva del baculovirus recombinante. Esto se registró como la potencia infectiva del baculovirus recombinante.
50

Ejemplo 4 Creación de partículas de tipo virus**(1) Expresión de proteínas estructurales utilizando baculovirus recombinantes**

55 Las células Sf9 fueron infectadas con cada uno de los baculovirus recombinantes a una M.O.I. (Multiplicidad de infección) de 1 a 10. Tras la infección, se añadió una suspensión del baculovirus recombinante gota a gota a las células, y el baculovirus recombinante se sometió a adsorción durante aproximadamente 60 minutos con sacudimiento suave. Después de eso, se añadió TC100 como medio de cultivo para células de insecto, seguido de incubación a 26,5°C durante 5 a 6 días.
60

(2) Identificación de las proteínas expresadas

Se tomaron muestras del sobrenadante de cultivo de cada una de las infecciones con virus recombinante periódicamente. Después de la resolución mediante SDS-PAGE, se detectó la proteína mediante tinción con azul de

Coomassie, y por medio del peso molecular esperado, se confirmó la validez de la proteína expresada. Adicionalmente, después de resolver la proteína mediante SDS-PAGE, se transfirió la proteína sobre una membrana de nitrocelulosa, y por medio de la técnica de transferencia Western, se identificó después la proteína expresada con suero de convaleciente de SRSV.

5

(3) Purificación y recuperación de las partículas de tipo virus

Las semillas de baculovirus recombinante se infectaron a una M.O.I. de 1 a 10. Después de la adsorción durante aproximadamente 60 minutos, se añadió "Ex-cell 400", seguido de incubación a 26,5°C durante 3 días. Después se añadió un inhibidor de proteasa, por ejemplo, pepstatina A o una leupeptina, al cultivo a una concentración final 1 mM, seguido de incubación adicional durante 2 a 3 días.

10

Después de la incubación, el cultivo se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4°C para recoger el sobrenadante de cultivo. El cultivo recogido se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos para eliminar el baculovirus recombinante. El sobrenadante se centrifugó a 25.000 rpm durante 4 horas en un "Beckmann SW28 Rotor" para que las partículas de tipo virus precipiten. A continuación, el tubo de centrifuga del cual se había descartado el sobrenadante se mantuvo boca abajo para eliminar por completo el sobrenadante. Después de eso, se añadió tampón Grace o PBS(-) (0,5 mL) con el inhibidor de proteasa incorporado al tubo de centrifuga, y se dejó que la centrifuga reposara durante la noche a 4°C.

15

Después del reposo, las partículas de tipo virus se suspendieron en el tampón Grace que contenía el inhibidor de proteasa que se había añadido, y se recuperaron. A las partículas de tipo virus recuperadas, se le añadió el tampón Grace que contenía inhibidor de proteasa o PBS(-) con CsCl (3,8 g) añadido para dar 13 mL. La mezcla resultante se ultracentrifugó a 16°C y 35.000 rpm durante 24 a 48 horas. Después de la ultracentrifugación, se recogió una banda de color pálido en la que se acumulaban las partículas de tipo virus. Tras una dilución 1/5 con tampón Grace que contenía inhibidor de proteasa, la suspensión resultante se ultracentrifugó a 45.000 rpm durante 3 horas en un "Beckmann TL100.3 Rotor" para que precipitaran las partículas de tipo virus.

20

25

Las partículas de tipo virus precipitadas se solubilizaron con tampón Grace o PBS(-) al cual se había añadido inhibidor de proteasa. Se prepararon soluciones de tampón Grace que contenía inhibidor de proteasa que contenían sacarosa del 10% al 50% en un tubo 4PA, al cual se había añadido en la parte superior la solución solubilizada de las partículas de tipo virus, seguido de centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa a 35.000 rpm durante 4 horas a 4°C. Después de la centrifugación, se recogió una banda de color pálido de partículas de tipo virus como partículas de tipo virus SRSV purificadas en una jeringa de 1 mL con una aguja 26G.

30

35

Las partículas de tipo virus SRSV purificadas se diluyeron con tampón Grace según se necesitara, y se midió la cantidad de proteína mediante el método Bradford.

40

Las partículas de tipo virus SRSV purificadas se sometieron a tinción negativa con acetato de uranilo, y a continuación se examinaron con el microscopio electrónico para averiguar si se habían formado o no partículas de tipo virus (FIGS. 2 a 12).

Ejemplo 5 Preparación Anticuerpos Inmunes y Anticuerpos Marcados mediante el Uso de Partículas de Tipo Virus

45

(1) Preparación de anticuerpos inmunes contra partículas de tipo virus

Se mezclaron un tampón de fosfato (pH 7,2, 1 mL) – que contenía partículas de tipo virus SRSV purificadas (500 µg) obtenidas de una de la cepa Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP, la cepa Hu/NLV/Seto 124/1989/JP, la cepa Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP, la cepa Hu/NLV/Narita 104/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP, y la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP - y el coadyuvante incompleto de Freund (1 mL), y a continuación se inmunizó un conejo blanco New Zealand (3 kg) de una manera conocida *per se* en la técnica. Tres semanas más tarde, el conejo se inmunizó adicionalmente con una mezcla de tampón de fosfato (pH 7,2, 1 mL), que contenía las partículas de tipo virus SRSV (0,25 µg), y el coadyuvante incompleto de Freund (1 mL) (dosis de refuerzo). Tres semanas más tarde, se llevó a cabo la inmunización como en la dosis de refuerzo, y aproximadamente 7 a 10 días después de la dosis de refuerzo, se llevó a cabo la exanguinación, y se separó el componente del suero.

55

Después de someter el suero separado y purificado a fraccionamiento con sulfato de amonio, se sometió a diálisis la fracción relevante durante la noche a 4°C frente a Tris-HCl 50 mM (pH 7,6). El producto dializado interno se sometió después a cromatografía en DEAE Sefarosa que había sido equilibrada con Tris-HCl 50 mM (pH 7,6). Bajo supervisión a una longitud de onda UV de 280 nm, se recogió un pico D.O. para obtener un anticuerpo IgG purificado en DEAE (anticuerpo anti-SRSV) contra las partículas de tipo virus.

60

(2) Preparación de anticuerpos marcados

Se marcó cada uno de los anticuerpo anti-SRSV con POD mediante una técnica mejorada con ácido peryódico ["Koso Men-eki Sokuteiho (Enzyme Immunoassay)", 2, 91, 1982]. Descrito de manera específica, se disolvió POD a 4 mg/mL en agua destilada y se añadió peryodato de sodio 0,1 M (0,2 mL), seguido de reacción a la temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. La mezcla de reacción se sometió a diálisis después durante la noche frente a tampón de acetato de sodio 1 mM (pH 4,0). Después de la diálisis, se añadió tampón de carbonato de sodio 0,2 M (pH 9,5, 0,02 mL) para ajustar el pH a 9,5, y al mismo tiempo, se añadió anticuerpo anti-SRSV (8 mg).

Después de dejar que reaccionaran a la temperatura ambiente durante 2 horas, se añadió borohidróxido de sodio de 4 mg/mL (0,1 mL), seguido de reacción a 4°C durante aproximadamente 2 horas. Después de la reacción, se llevó a cabo la filtración en gel con "Sephacryl S-200" mientras se utilizaba tampón de fosfato 10 mM. Bajo supervisión a una longitud de onda UV de 280 nm, se recogió una fracción de anticuerpo anti-SRSV marcado con POD.

(3) Preparación de una microplaca de anticuerpo anti-SRSV en fase sólida

Los anticuerpos anti-SRSV se diluyeron por separado con un tampón de carbonato (pH 9,5) a una concentración de 0,5 a 10 µg/mL y después se vertieron a 100 µL/pocillos en una microplaca de fondo plano de poliestireno (fabricada por Nunc). Después se permitió que la microplaca reposara durante la noche a 4°C. Después de reposar durante 18 horas o más, la microplaca se lavó de 3 a 4 veces a 200 µL/pocillos con PBS que contenía "Tween 20" a una concentración final de 0,05%. A continuación se añadió PBS 10 mM (pH 7,2) – que contenía albúmina de suero bovino (BSA) y "Tween 20" a concentraciones finales de 0,5% y 0,05%, respectivamente – a 200 µL/pocillo. Se dejó reposar la microplaca durante la noche a 4°C para obtener una microplaca con anticuerpo anti-SRSV en fase sólida.

Ejemplo 6 Reactividad Cruzada**(1) ELISA de Detección de Antígeno**

Las partículas de tipo virus SRSV purificadas de cada grupo se diluyeron entre 4 ng/mL y 0,04 ng/mL con una solución que contenía albúmina de suero bovino (BSA) y "Tween 20" a concentraciones finales de 0,2% y 0,05%, respectivamente, en un tampón (PBS 10 mM, pH 7,2).

A continuación, se añadieron cada una de las emulsiones diluidas de las partículas de tipo virus (VLP) a 100 µL/pocillo a los pocillos de la correspondiente microplaca de anticuerpo anti-SRSV en fase sólida, seguido de una reacción a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras la reacción, las mezclas de reacción de los pocillos se eliminaron mediante succión. Se añadió a los pocillos PBS 10 mM (pH 7,2) que contenía "Tween 20" a una concentración final de 0,05% a 200 µL/pocillo, y después se eliminó mediante succión del mismo modo. Este procedimiento se repitió al menos tres veces. Después de lavar, se añadió el anticuerpo anti-SRSV marcado con POD del correspondiente serotipo, que se había diluido 1/20000 con un tampón, a 100 µL/pocillo, seguido de reacción a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Después del lavado, se añadió una solución de TMB con peróxido de hidrógeno a 100 µL/pocillo, seguido de reacción a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la reacción, se añadió ácido sulfúrico 0,6 N a 100 µL/pocillo, y se midió la absorbancia (450 nm/630 nm) de cada pocillo por medio de un lector automático de ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

ES 2 398 413 T3

Tabla 2 Reactividad cruzada entre Serotipos

VLP Purificadas	Concentración VLP (ng/mL)	Placa de anticuerpo en fase sólida x POD (superior: nombre de la cepa, inferior: dilución de anticuerpo marcado con POD)										
		124 20000	258 20000	407 20000	645 20000	104 20000	809 20000	754 20000	1876 20000	47 20000	7k 20000	10-25 20000
124	4	1,430	0,018	0,013	0,016	0,013	0,007	0,007	0,008	0,010	0,019	0,009
	0,4	0,192	0,011	0,010	0,011	0,014	0,007	0,007	0,008	0,011	0,018	0,009
	0,04	0,030	0,011	0,011	0,011	0,013	0,007	0,007	0,009	0,012	0,018	0,009
258	4	0,042	1,831	0,114	0,020	0,015	0,009	0,007	0,010	0,012	0,019	0,010
	0,4	0,013	0,270	0,022	0,013	0,016	0,009	0,007	0,009	0,013	0,019	0,011
	0,04	0,008	0,043	0,012	0,011	0,017	0,008	0,007	0,009	0,012	0,018	0,010
407	4	0,084	0,045	0,974	0,010	0,015	0,007	0,007	0,009	0,011	0,018	0,009
	0,4	0,016	0,012	0,134	0,010	0,013	0,007	0,008	0,009	0,011	0,018	0,009
	0,04	0,009	0,010	0,025	0,011	0,014	0,007	0,007	0,008	0,011	0,019	0,009
645	4	0,149	0,034	0,023	0,320	0,016	0,008	0,008	0,009	0,011	0,020	0,010
	0,4	0,024	0,013	0,012	0,045	0,017	0,009	0,008	0,009	0,012	0,019	0,011
	0,04	0,010	0,010	0,011	0,014	0,015	0,009	0,008	0,008	0,012	0,021	0,011
104	4	0,007	0,009	0,009	0,010	0,708	0,007	0,015	0,025	0,017	0,031	0,009
	0,4	0,010	0,009	0,009	0,010	0,094	0,008	0,008	0,011	0,013	0,020	0,009
	0,04	0,009	0,009	0,010	0,011	0,024	0,008	0,007	0,009	0,012	0,020	0,009
809	4	0,013	0,012	0,012	0,011	0,114	0,877	0,047	0,143	0,046	0,080	0,017
	0,4	0,010	0,010	0,011	0,011	0,030	0,134	0,013	0,033	0,018	0,028	0,013
	0,04	0,009	0,010	0,010	0,010	0,017	0,022	0,008	0,011	0,014	0,020	0,011
754	4	0,008	0,011	0,009	0,010	0,038	0,008	0,286	0,068	0,025	0,027	0,013
	0,4	0,008	0,009	0,010	0,011	0,017	0,008	0,038	0,015	0,013	0,020	0,010
	0,04	0,009	0,009	0,011	0,011	0,016	0,008	0,011	0,010	0,012	0,020	0,009
1876	4	0,010	0,012	0,011	0,011	0,026	0,009	0,013	0,728	0,023	0,025	0,012
	0,4	0,009	0,014	0,010	0,011	0,017	0,009	0,008	0,089	0,015	0,021	0,013
	0,04	0,011	0,010	0,010	0,012	0,016	0,010	0,007	0,017	0,014	0,019	0,011
47	4	0,008	0,009	0,009	0,010	0,017	0,007	0,008	0,011	0,324	0,021	0,014
	0,4	0,008	0,009	0,009	0,011	0,015	0,008	0,008	0,009	0,048	0,020	0,013
	0,04	0,008	0,009	0,009	0,011	0,014	0,008	0,008	0,008	0,017	0,022	0,011
7k	4	0,009	0,010	0,010	0,011	0,019	0,009	0,010	0,011	0,015	0,160	0,014
	0,4	0,009	0,011	0,010	0,011	0,016	0,008	0,008	0,008	0,015	0,035	0,016
	0,04	0,011	0,010	0,010	0,011	0,017	0,009	0,008	0,009	0,014	0,022	0,015
10-25	4	0,009	0,010	0,010	0,011	0,098	0,010	0,022	0,069	0,033	0,058	1,050
	0,4	0,007	0,009	0,010	0,011	0,026	0,009	0,009	0,020	0,018	0,026	0,163
	0,04	0,009	0,009	0,009	0,012	0,016	0,009	0,007	0,011	0,015	0,023	0,029
Blanco		0,009	0,011	0,010	0,011	0,016	0,009	0,008	0,009	0,017	0,022	0,016

En la tabla, "645" indica la cepa Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP, "124" la cepa Hu/NLV/Seto 124/1989/JP, "258" la cepa Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP, "407" la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP, "104" la cepa Hu/NLV/Narita 104/1997/JP, "809" la cepa Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP, "754" la cepa Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP, "1876" la cepa Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP, "47" la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP, "7k" la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP, y "10-25" la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP.

Como resultado, no se observó reactividad cruzada entre los virus del mismo genogrupo, por no hablar de la

reactividad cruzada entre virus de los diferentes Genogrupos I y II. Se confirmó, por lo tanto, que los serotipos de los 11 tipos de cepas de virus utilizados eran diferentes entre sí.

Ensayo 1 Discriminación de los SRSV del Genogrupo

Los anticuerpos anti-SRSV contra los SRSV pertenecientes al Genogrupo I (la cepa Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP, la cepa Hu/NLV/Seto 124/1989/JP, la cepa Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP, y la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP) se diluyeron con un tampón de carbonato (pH 9,5) a una concentración de 0,5 a 10 µg/mL y después se mezclaron. La mezcla así obtenida se vertió a 100 µL/pocillo en una microplaca de fondo plano de poliestireno (fabricada por Nunc). La microplaca se dejó reposar durante la noche a 4°C. Tras dejar reposar durante 18 horas o más, la microplaca se lavó de 3 a 4 veces a 200 µL/pocillo con PBS que contenía "Tween 20" a una concentración final de 0,05%. Después se añadieron PBS 10 mM (pH 7,2) – que contenía albúmina de suero bovino (BSA) y "Tween 20" a concentraciones finales de 0,5% y 0,05%, respectivamente – a 200 µL/pocillo. Se dejó reposar la microplaca durante la noche a 4°C para obtener una microplaca con los anticuerpos IgG anti-SRSV contra los respectivos serotipos del Genogrupo I portados en una forma en fase sólida mixta (placa de Tipo I).

A continuación, se formaron de un modo similar los anticuerpos anti-SRSV contra los SRSV pertenecientes al Genogrupo II (la cepa Hu/NLV/Narita 104/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP, y la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP) en una fase sólida para obtener una placa de Tipo II.

A las heces (0,5 a 1,0 g) de cada paciente con SRSV, se le añadieron PBS (9 mL) y "Daiflon" (1 mL), seguido de homogeneización. La suspensión preparada de este modo se centrifugó a 19.000 g durante 20 minutos, y el sobrenadante se recogió y se formó en una emulsión fecal al 10%. La emulsión fecal al 10% se diluyó 1:1 en volumen con un tampón. La emulsión diluida se añadió a 100 µL/pocillo a pocillos de placas de Tipo I y Tipo II, y se dejó reaccionar a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras la reacción, las mezclas de reacción se eliminaron por succión. Se añadió PBS 10 mM (pH 7,2) – que contenía "Tween 20" a una concentración final de 0,05% - a 200 µL/pocillo a los pocillos, y después se eliminó por succión. Este procedimiento se realizó al menos tres veces. Después de lavar los anticuerpos anti-SRSV marcados con POD de los respectivos serotipos, dichos anticuerpos que habían sido diluidos 1/20.000 con un tampón, se añadieron a 100 µL/pocillo, y después se hicieron reaccionar a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de lavar, se añadió una solución de TMB con peróxido de hidrógeno a 100 µL/pocillo, y a continuación se hicieron reaccionar a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la reacción, se añadió ácido sulfúrico 0,6 N a 100 µL/pocillo, y se midió la absorbancia (450 nm/630 nm) de cada pocillo por medio de un lector automático de ELISA.

Como resultado, se encontró que entre los 15 especímenes fecales de pacientes infectados con SRSV del Genogrupo I, 14 especímenes fecales reaccionaron solamente con la placa de Tipo I y no reaccionaron con la placa de Tipo II. Con respecto a los 7 especímenes fecales de pacientes infectados con SRSV del Genogrupo II, por otra parte, 6 especímenes fecales no reaccionaron con la placa de Tipo I sino que reaccionaron solamente con la placa Tipo II. Se ha confirmado, por lo tanto, que la discriminación en el genogrupo es realmente factible.

Test 2 Discriminación de los SRSV en el Serotipo

Se diluyeron cada uno de los anticuerpos anti-SRSV contra los SRSV (la cepa Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP, la cepa Hu/NLV/Seto 124/1989/JP, la cepa Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP, la cepa Hu/NLV/Narita 104/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP, y la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP) independientemente con un tampón de carbonato (pH 9,5) a una concentración de 0,5 a 10 µg/mL. Las diluciones así obtenidas se vertieron a 100 µL/pocillo en una microplaca de fondo plano de poliestireno (fabricada por Nunc). La microplaca se dejó reposar durante la noche a 4°C. Después de haber dejado reposar durante 18 horas o más, la microplaca se lavó de 3 a 4 veces a 200 µL/pocillo con PBS que contenía "Tween 20" a una concentración final de 0,05%. Después se añadió PBS 10 mM (pH 7,2) – que contenía albúmina de suero bovino (BSA) y "Tween 20" a concentraciones finales de 0,5% y 0,05%, respectivamente - a 200 µL/pocillo. La microplaca se dejó reposar durante la noche a 4°C para obtener una microplaca de anticuerpo anti-SRSV en fase sólida (placa de discriminación de serotipo).

Con respecto a los especímenes fecales de pacientes con SRSV, se llevó a cabo un ELISA de una manera similar a la del Ensayo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Ensayo Clínico

Número total de especímenes: 41	
Serotipo discriminado por el kit de la invención	Número de especímenes detectados
HU/NLV/Kashiwa 645/1999/JP	1
Hu/NLV/Seto 124/1989/JP	7
Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP	4
Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP	1
HU/NLV/Narita 104/1997/JP	4
Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP	12
Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP	2
Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP	3
Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP	1
Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP	1
Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP	2
Número total de especímenes detectados	38 (93%)

5 Como resultado, se ha encontrado que de acuerdo con el método de detección de SRSV de la presente invención, los SRSV se pueden detectar con una probabilidad tal elevada como el 93% y sus serotipos también se pueden discriminar.

Adicionalmente, los serotipos discriminados por el kit de la presente invención fueron coincidentes con los averiguados mediante PCR y un análisis de sus secuencias de bases (Tabla 4).

10 Tabla 4 Comprobación de los Serotipos

Número total de especímenes: 38		
Serotipo discriminado por el kit de la invención		Número de especímenes discriminados en serotipo por PCR y análisis de las secuencias de bases
HU/NLV/Kashiwa 645/1999/JP	1 Especímenes	1
Hu/NLV/Seto 124/1989/JP	7 Especímenes	7
Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP	4 Especímenes	4
Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP	1 Espécimen	1
HU/NLV/Narita 104/1997/JP	4 Especímenes	4
Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP	12 Especímenes	12
Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP	2 Especímenes	2
Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP	3 Especímenes	3
Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP	1 Espécimen	1
Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP	1 Espécimen	1
Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP	2 Especímenes	2

5 Los anticuerpos anti-SRSV contra los SRSV (la cepa Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP, la cepa Hu/NLV/Seto 124/1989/JP, la cepa Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP, la cepa Hu/NLV/Narita 104/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP, la cepa Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP, la cepa Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP, la cepa Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP, y la cepa Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP) fueron diluidos cada uno independientemente con un tampón de carbonato (pH 9,5) a una concentración de 0,5 a 10 µg/mL. Todas las diluciones así obtenidas se mezclaron. Como alternativa, los anticuerpos anti-SRSV pueden ser diluidos después de mezclarlos entre sí. Utilizando la mezcla diluida de este modo de los anticuerpos anti-SRSV, se produjo del mismo modo una microplaca de anticuerpo anti-SRSV en fase
10 sólida. Con respecto a los 22 especímenes fecales de pacientes infectados con SRSV, se llevó a cabo un ELISA de una manera similar a la del Ensayo 1. Fue posible detectar SRSV en 20 especímenes.

Aplicabilidad Industrial

15 De acuerdo con el kit de detección de SRSV de la presente invención, es posible detectar la mayor parte de los virus relacionados con SRSV descubiertos hasta la fecha y también discriminar sus serotipos y genogrupos. Cuando se produce un envenenamiento alimentario relacionado con SRSV, el kit de detección de SRSV de la presente invención es, por lo tanto útil para especificar una ruta de infección, evitar que la infección se propague, y realizar
20 una investigación epidemiológica.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DENKA SEIKEN CO., LTD
 Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

<120> Kit de Detección para SRSV

<130> DK0001

<150> JP P1999-175928

<151> 1999-06-22

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 545

<212> PRT

<213> Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP

<400> 1

Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Pro Thr Asn Met Asp Gly Thr Ser
 1 5 10 15

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

Met Glu Pro Val Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr Ala Gly Gln
 35 40 45

Val Asn Met Ile Asp Pro Trp Ile Met Asn Asn Tyr Val Gln Ala Pro
 50 55 60

Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Ile Leu
 65 70 75 80

Phe Asp Leu Gln Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Ser His Leu
 85 90 95

Ala Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Lys Val Lys Val Leu
 100 105 110

Leu Ala Gly Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Ile Ser Cys Ile
 115 120 125

5

10

15

ES 2 398 413 T3

Pro Pro Gly Phe Ala Ala Gln Asn Ile Ser Ile Ala Gln Ala Thr Met
 130 135 140

Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Val Leu Glu Pro Ile Glu Val
 145 150 155 160

Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Phe His Asn Asn Asp Asn Ala
 165 170 175

Pro Thr Met Arg Leu Val Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Ser
 180 185 190

Gly Ser Ser Ser Gly Thr Asp Pro Phe Val Ile Ala Gly Arg Val Leu
 195 200 205

Thr Cys Pro Ser Pro Asp Phe Ser Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Asn
 210 215 220

Val Glu Gln Lys Thr Lys Pro Phe Ser Val Pro Asn Leu Pro Leu Asn
 225 230 235 240

Thr Leu Ser Asn Ser Arg Val Pro Ser Leu Ile Lys Ser Met Met Val
 245 250 255

Ser Arg Asp His Gly Gln Met Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Val Thr
 260 265 270

Leu Asp Gly Gln Leu Gln Gly Thr Thr Pro Thr Ser Ala Ser Gln Leu
 275 280 285

Cys Lys Ile Arg Gly Ser Val Phe His Ala Asn Gly Gly Asn Gly Tyr
 290 295 300

Asn Leu Thr Glu Leu Asp Gly Ser Pro Tyr His Ala Phe Glu Ser Pro
 305 310 315 320

Ala Pro Ile Gly Phe Pro Asp Leu Gly Glu Cys Asp Trp His Met Glu
 325 330 335

Ala Ser Pro Thr Thr Gln Phe Asn Thr Gly Asp Val Ile Lys Gln Ile
 340 345 350

Asn Val Lys Gln Glu Ser Ala Phe Ala Pro His Leu Gly Thr Ile Gln
 355 360 365

Ala Asp Gly Leu Ser Asp Val Ser Val Asn Thr Asn Met Ile Ala Lys

ES 2 398 413 T3

370 375 380
 Leu Gly Trp Val Ser Pro Val Ser Asp Gly His Arg Gly Asp Val Asp
 385 390 395 400
 Pro Trp Val Ile Pro Arg Tyr Gly Ser Thr Leu Thr Glu Ala Ala Gln
 405 410 415
 Leu Ala Pro Pro Ile Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu Ala Ile Val Phe
 420 425 430
 Phe Met Ser Asp Phe Pro Ile Ala His Gly Thr Asn Gly Leu Ser Val
 435 440 445
 Pro Cys Thr Ile Pro Gln Glu Phe Val Thr His Phe Val Asn Glu Gln
 450 455 460
 Ala Pro Thr Arg Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Leu Asp Pro Asp
 465 470 475 480
 Thr His Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Pro Glu Gly Phe Met
 485 490 495
 Thr Cys Val Pro Asn Ser Ser Gly Thr Gly Pro Gln Thr Leu Pro Ile
 500 505 510
 Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu
 515 520 525
 Lys Pro Val Gly Thr Ala Gly Pro Ala Cys Arg Leu Gly Ile Arg Arg
 530 535 540

Ser
 545
 <210> 2
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Hu/NLV/Seto 129/1989/JP
 <400> 2
 Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Thr Ser Ser Val Asp Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Ala

5

ES 2 398 413 T3

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

ES 2 398 413 T3

Asp Gly Arg Leu Val Gly Thr Thr Pro Val Ser Leu Ser His Val Ala
 275 280 285

Lys Ile Arg Gly Thr Ser Asn Gly Thr Val Ile Asn Leu Thr Glu Leu
 290 295 300

Asp Gly Thr Pro Phe His Pro Phe Glu Gly Pro Ala Pro Ile Gly Phe
 305 310 315 320

Pro Asp Leu Gly Gly Cys Asp Trp His Ile Asn Met Thr Gln Phe Gly
 325 330 335

His Ser Ser Gln Thr Gln Tyr Asp Val Asp Thr Thr Pro Asp Thr Phe
 340 345 350

Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln Ala Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn
 355 360 365

Tyr Ile Gly Val Leu Ser Trp Val Ser Pro Pro Ser His Pro Ser Gly
 370 375 380

Ser Gln Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr
 385 390 395 400

Glu Ala Thr His Leu Ala Pro Ser Val Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu
 405 410 415

Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Ile Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Ser
 420 425 430

Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Ser His Leu Ala Ser Glu
 435 440 445

Gln Ala Pro Thr Val Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro
 450 455 460

Asp Thr Gly Arg Thr Leu Gly Glu Phe Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe
 465 470 475 480

Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro
 485 490 495

Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln
 500 505 510

Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Ser Ala Arg Gly Arg Leu Gly Leu
 515 520 525

Arg Arg
 530
 <210> 3
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP

ES 2 398 413 T3

<400> 3

Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Pro Gln Ser Ala Asp Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Thr Ala Asp Pro Leu Pro
 20 25 30

Met Glu Pro Val Ala Gly Pro Thr Thr Ala Val Ala Thr Ala Gly Gln
 35 40 45

Val Asn Met Ile Asp Pro Trp Ile Val Asn Asn Phe Val Gln Ser Pro
 50 55 60

Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Ile Leu
 65 70 75 80

Phe Asp Leu Gln Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Ser His Leu
 85 90 95

Ser Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Arg Val Arg Ile Leu
 100 105 110

Leu Ala Gly Asn Ala Phe Ser Ala Gly Lys Ile Ile Val Cys Cys Val
 115 120 125

Pro Pro Gly Phe Thr Ser Ser Ser Leu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Leu
 130 135 140

Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Ile Glu Met
 145 150 155 160

Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Tyr His Thr Asn Asp Asn Gln
 165 170 175

ES 2 398 413 T3

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

ES 2 398 413 T3

	420		425		430						
Val Ser Ala Phe Pro Gly Pro Asn Asn Arg Ser Ala Pro Asn Asp Val	435		440		445						
Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Thr His Phe Val Ser Glu Gln	450		455		460						
Ala Pro Thr Met Gly Asp Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro Asp	465		470		475						480
Thr Asn Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Pro Gly Gly Tyr Leu		485		490							495
Thr Cys Val Pro Asn Gly Val Gly Ala Gly Pro Gln Gln Leu Pro Leu		500		505							510
Asn Gly Val Phe Leu Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu		515		520							525
Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Thr Ala Arg Ser Arg Leu Gly Val Arg		530		535							540
Arg Ile											
545											
<210> 4											
<211> 544											
<212> PRT											
<213> Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP											
<400> 4											
Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Thr Pro Ser Ala Asp Gly Ala Thr	1		5		10					15	
Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Thr Ala Asp Pro Ile Pro		20		25						30	
Ile Asp Pro Val Ala Gly Ser Ser Thr Ala Leu Ala Thr Ala Gly Gln		35		40						45	
Val Asn Leu Ile Asp Pro Trp Ile Ile Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro		50		55						60	
Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Val Leu											

ES 2 398 413 T3

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

ES 2 398 413 T3

Ala Gly Phe Pro Asp Leu Gly Ser Cys Asp Trp His Ile Glu Met Ser
 325 330 335

Lys Ile Pro Asn Ser Ser Thr Gln Asn Asn Pro Ile Val Thr Asn Ser
 340 345 350

Val Lys Pro Asn Ser Gln Gln Phe Val Pro His Leu Ser Ser Ile Thr
 355 360 365

Leu Asp Glu Asn Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Gly Thr Ile Gln
 370 375 380

Trp Thr Ser Pro Pro Ser Asp Ser Gly Gly Ala Asn Thr Asn Phe Trp
 385 390 395 400

Lys Ile Pro Asp Tyr Gly Ser Ser Leu Ala Glu Ala Ser Gln Leu Ala
 405 410 415

Pro Ala Val Tyr Pro Pro Gly Phe Asn Glu Val Ile Val Tyr Phe Met
 420 425 430

Ala Ser Ile Pro Gly Pro Asn Gln Ser Gly Ser Pro Asn Leu Val Pro
 435 440 445

Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Thr His Phe Ile Ser Glu Gln Ala
 450 455 460

Pro Ile Gln Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro Asp Thr
 465 470 475 480

Asn Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Pro Gly Gly Tyr Leu Thr
 485 490 495

Cys Val Pro Asn Ser Ser Ser Thr Gly Pro Gln Gln Leu Pro Leu Asp
 500 505 510

Gly Val Phe Val Phe Ala Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu Lys
 515 520 525

Pro Val Gly Thr Ala Gly Pro Ala Arg Gly Arg Leu Gly Val Arg Arg
 530 535 540

<210> 5
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Hu/NLV/Narita 104/1997/JP

ES 2 398 413 T3

<400> 5

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Thr Ala
 1 5 10 15

Asn Leu Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val
 20 25 30

Val Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile
 35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe
 50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala Pro
 65 70 75 80

Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met Tyr
 85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly Asn
 100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe
 115 120 125

Pro Thr Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Met Phe Pro His Ile
 130 135 140

Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro Asp
 145 150 155 160

Val Arg Asn Asn Phe Tyr His Tyr Asn Gln Ser Asn Asp Ser Thr Ile
 165 170 175

Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly
 180 185 190

Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro
 195 200 205

ES 2 398 413 T3

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

ES 2 398 413 T3

450 455 460

Ala Pro Ala Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Arg Phe Val Asn Pro Asp
465 470 475 480

Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Cys Lys Leu His Lys Ser Gly Tyr Val
485 490 495

Thr Val Ala His Thr Gly Pro His Asp Leu Val Ile Pro Pro Asn Gly
500 505 510

Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Thr Leu Ala Pro
515 520 525

Met Gly Asn Gly Ala Gly Arg Arg Arg Ala Leu
530 535

<210> 6

<211> 548

<212> PRT

<213> Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP

<400> 6

5

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala
1 5 10 15

Gly Leu Val Pro Glu Ile Asn Asn Glu Ala Met Ala Leu Asp Pro Val
20 25 30

Ala Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Leu Thr Gly Gln Gln Asn Ile Ile
35 40 45

Asp Pro Trp Ile Met Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe
50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Glu
65 70 75 80

Leu Gly Pro Glu Ile Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr
85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Val Leu Ala Gly Asn
100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Ile Pro Pro Asn Phe

ES 2 398 413 T3

115	120	125
Pro Ile Asp Asn Leu Ser Ala Ala Gln Ile Thr Met Cys Pro His Val		
130	135	140
Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Asn Leu Pro Met Pro Asp		
145	150	155
Val Arg Asn Asn Phe Phe His Tyr Asn Gln Gly Ser Asp Ser Arg Leu		
	165	170
Arg Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ser Gly		
	180	185
Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro		
	195	200
Asp Phe Ser Phe Asn Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr		
	210	215
Lys Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Ile Ser Glu Met Ser Asn Ser		
225	230	235
Arg Phe Pro Val Pro Ile Glu Ser Leu His Thr Ser Pro Thr Glu Asn		
	245	250
Ile Val Val Gln Cys Gln Asn Gly Arg Val Thr Leu Asp Gly Glu Leu		
	260	265
Met Gly Thr Thr Gln Leu Leu Pro Ser Gln Ile Cys Ala Phe Arg Gly		
	275	280
Val Leu Thr Arg Ser Thr Ser Arg Ala Ser Asp Gln Ala Asp Thr Ala		
	290	295
Thr Pro Arg Leu Phe Asn Tyr Tyr Trp His Val Gln Leu Asp Asn Leu		
305	310	315
Asn Gly Thr Pro Tyr Asp Pro Ala Glu Asp Ile Pro Gly Pro Leu Gly		
	325	330
Thr Pro Asp Phe Arg Gly Lys Val Phe Gly Val Ala Ser Gln Arg Asn		
	340	345
Leu Asp Ser Thr Thr Arg Ala His Glu Ala Lys Val Asp Thr Thr Ala		
	355	360
		365

ES 2 398 413 T3

Gly Arg Phe Thr Pro Lys Leu Gly Ser Leu Glu Ile Ser Thr Asp Ser
 370 375 380
 Asp Asp Phe Asp Gln Asn Gln Pro Thr Lys Phe Thr Pro Val Gly Ile
 385 390 395 400
 Gly Val Asp Asn Glu Ala Glu Phe Gln Gln Trp Ser Leu Pro Asp Tyr
 405 410 415
 Ser Gly Gln Phe Thr His Asn Met Asn Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro
 420 425 430
 Asn Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu Phe Phe Arg Ser Gln Leu Pro Ser
 435 440 445
 Ser Gly Gly Arg Ser Asn Gly Val Leu Asp Cys Leu Val Pro Gln Glu
 450 455 460
 Trp Val Gln His Phe Tyr Gln Glu Ser Ala Pro Ala Gln Thr Gln Val
 465 470 475 480
 Ala Leu Val Arg Tyr Val Asn Pro Asp Thr Gly Lys Val Leu Phe Glu
 485 490 495
 Ala Lys Leu His Lys Leu Gly Phe Met Thr Ile Ala Asn Asn Gly Asp
 500 505 510
 Ser Pro Ile Thr Val Pro Pro Asn Gly Tyr Phe Arg Phe Glu Ser Trp
 515 520 525
 Val Asn Pro Phe Tyr Thr Leu Ala Pro Met Gly Thr Gly Asn Gly Arg
 530 535 540
 Arg Arg Ile Gln
 545
 <210> 7
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP
 <400> 7
 Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Thr Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala
 1 5 10 15

5

ES 2 398 413 T3

Gly Leu Val Pro Glu Ser Asn Asn Glu Ala Met Ala Leu Glu Pro Val
 20 25 30

Val Gly Ala Ser Leu Ala Ala Pro Val Thr Gly Gln Thr Asn Ile Ile
 35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Thr Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe
 50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Val Asn Leu Glu
 65 70 75 80

Leu Gly Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr
 85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Met Glu Val Gln Val Met Leu Ala Gly Asn
 100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Tyr Phe
 115 120 125

Pro Val Glu Asn Leu Ser Pro Ser Gln Ile Thr Met Phe Pro His Val
 130 135 140

Ile Ile Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Met Pro Asp
 145 150 155 160

Val Arg Ser Thr Leu Phe His Phe Asn Gln Lys Asp Glu Pro Lys Met
 165 170 175

Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly
 180 185 190

Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Ile Leu Thr Arg Pro Ser Pro
 195 200 205

Glu Phe Asp Phe Thr Tyr Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr
 210 215 220

Lys Pro Phe Thr Leu Pro Val Leu Thr Leu Gly Glu Leu Ser Asn Ser
 225 230 235 240

Arg Phe Pro Leu Ser Ile Asp Glu Met Val Thr Ser Pro Asn Glu Ser
 245 250 255

ES 2 398 413 T3

Ile Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Val Thr Leu Asp Gly Glu Leu
 260 265 270

Leu Gly Thr Thr Gln Leu Gln Ala Cys Asn Ile Cys Ser Ile Arg Gly
 275 280 285

Lys Val Thr Gly Gln Val Pro Ser Glu Gln His Met Trp Asn Leu Glu
 290 295 300

Ile Thr Asn Leu Asn Gly Thr Gln Phe Asp Pro Thr Asp Asp Val Pro
 305 310 315 320

Ala Pro Leu Gly Val Pro Asp Phe Ala Gly Glu Val Phe Gly Val Leu
 325 330 335

Ser Gln Arg Asn Arg Gly Glu Ser Asn Pro Ala Asn Arg Ala His Asp
 340 345 350

Ala Val Val Ala Thr Tyr Ser Asp Lys Tyr Thr Pro Lys Leu Gly Leu
 355 360 365

Val Gln Ile Gly Thr Trp Asn Thr Asn Asp Val Glu Asn Gln Pro Thr
 370 375 380

Lys Phe Thr Pro Ile Gly Leu Asn Glu Val Ala Asn Gly His Arg Phe
 385 390 395 400

Glu Gln Trp Thr Leu Pro Arg Tyr Ser Gly Ala Leu Thr Leu Asn Met
 405 410 415

Asn Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Leu Phe Pro Gly Glu Arg Leu Leu
 420 425 430

Phe Phe Arg Ser Tyr Val Pro Leu Lys Gly Gly Phe Gly Asn Pro Ala
 435 440 445

Ile Asp Cys Ser Val Pro Gln Glu Trp Val Gln His Phe Tyr Gln Glu
 450 455 460

Ser Ala Pro Ser Leu Gly Asp Val Ala Leu Val Arg Tyr Val Asn Pro
 465 470 475 480

Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Ala Lys Leu His Lys Gly Gly Phe
 485 490 495

Leu Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Gly Pro Val Val Val Pro Ala Asn
 500 505 510

Gly Tyr Phe Lys Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser Leu Ala
 515 520 525

Pro Met Gly Thr Gly Asn Gly Arg Arg Arg Val Gln
 530 535 540

ES 2 398 413 T3

5

<210> 8
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP
 <400> 8
 Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Pro Glu Ala Asn Asn Glu Thr Met Ala Leu Glu Pro Val
 20 25 30
 Ala Gly Ala Ser Ile Ala Ala Pro Leu Thr Gly Gln Asn Asn Ile Ile
 35 40 45
 Asp Pro Trp Ile Arg Leu Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe
 50 55 60
 Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Glu
 65 70 75 80
 Leu Gly Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ser Arg Met Tyr
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Val Glu Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Asn
 100 105 110
 Ala Phe Thr Ala Gly Lys Leu Val Phe Ala Ala Val Pro Pro His Phe
 115 120 125
 Pro Leu Glu Asn Ile Ser Pro Gly Gln Ile Thr Met Phe Pro His Val
 130 135 140
 Ile Ile Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Leu Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Arg Asn Asn Phe Phe His Tyr Asn Gln Gln Asn Glu Pro Arg Met

ES 2 398 413 T3

	165		170		175
Arg Leu Val	Ala Met Leu Tyr Thr	Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly			
	180	185		190	
Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro					
	195	200		205	
Asp Phe Asp Phe Asn Tyr Leu Val Pro Pro Thr Leu Glu Ser Lys Thr					
	210	215		220	
Lys Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Ile Gly Glu Leu Thr Asn Ser					
	225	230		235	240
Arg Phe Pro Val Pro Ile Asp Glu Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Glu Ser					
	245	250		255	
Leu Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Cys Ala Leu Asp Gly Glu Leu					
	260	265		270	
Gln Gly Thr Thr Gln Leu Leu Pro Thr Ala Ile Cys Ser Phe Arg Gly					
	275	280		285	
Arg Ile Asn Gln Lys Val Ser Gly Glu Asn His Val Trp Asn Met Gln					
	290	295		300	
Val Thr Asn Ile Asn Gly Thr Pro Phe Asp Pro Thr Gly Asp Val Pro					
	305	310		315	320
Ala Pro Leu Gly Thr Pro Asp Phe Ser Gly Lys Leu Phe Gly Val Leu					
	325	330		335	
Ser Gln Arg Asp His Asp Asn Ala Cys Arg Ser His Asp Ala Val Ile					
	340	345		350	
Ala Thr Asn Ser Ala Lys Phe Thr Pro Lys Leu Gly Ala Ile Gln Ile					
	355	360		365	
Gly Thr Trp Glu Glu Asp Asp Val His Ile Asn Gln Pro Thr Lys Phe					
	370	375		380	
Thr Pro Val Gly Leu Phe Glu Asn Glu Gly Phe Asn Gln Trp Thr Leu					
	385	390		395	400
Pro Asn Tyr Ser Gly Ala Leu Thr Leu Asn Met Gly Leu Ala Pro Pro					
	405	410		415	

ES 2 398 413 T3

Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Ile Leu Phe Phe Arg Ser His
 420 425 430

Ile Pro Leu Lys Gly Gly Val Ala Asp Pro Val Ile Asp Cys Leu Leu
 435 440 445

Pro Gln Glu Trp Ile Gln His Leu Tyr Gln Glu Ser Ala Pro Ser Gln
 450 455 460

Ser Asp Val Ala Leu Ile Arg Phe Thr Asn Pro Asp Thr Gly Arg Val
 465 470 475 480

Leu Phe Glu Ala Lys Leu His Arg Ser Gly Tyr Ile Thr Val Ala Asn
 485 490 495

Thr Gly Ser Arg Pro Ile Val Val Pro Ala Asn Gly Tyr Phe Arg Phe
 500 505 510

Asp Thr Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser Leu Ala Pro Met Gly Thr Gly
 515 520 525

Asn Gly Arg Arg Arg Val Gln
 530 535

<210> 9

<211> 542

<212> PRT

<213> Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP

<400> 9

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Ser Leu Val Pro Glu Gly Ile Asn Glu Thr Met Pro Leu Glu Pro Val
 20 25 30

Ala Gly Ala Ser Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Thr Asn Ile Ile
 35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Thr Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe
 50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asn Leu Glu
 65 70 75 80

5

ES 2 398 413 T3

Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ser Arg Met Tyr
 85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Val Glu Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Asn
 100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Leu Phe Ala Ala Ile Pro Pro Asn Phe
 115 120 125

Leu Val Asp Met Ile Ser Pro Ala Gln Ile Thr Met Leu Pro His Leu
 130 135 140

Ile Val Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Ile Met Thr Pro Leu Pro Asp
 145 150 155 160

Val Arg Asn Val Phe Tyr His Phe Asn Asn Gln Pro Gln Pro Arg Met
 165 170 175

Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly
 180 185 190

Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Thr Pro
 195 200 205

Asp Phe Glu Phe Ile Tyr Leu Val Pro Pro Ser Val Glu Ser Lys Thr
 210 215 220

Lys Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Ile Ser Glu Leu Thr Asn Ser
 225 230 235 240

Arg Phe Pro Ile Pro Ile Glu Gln Leu Tyr Thr Ala Pro Asn Glu Thr
 245 250 255

Asn Val Val Gln Cys Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu Asp Gly Glu Leu
 260 265 270

Gln Gly Thr Thr Gln Leu Leu Ser Ser Ala Val Cys Phe Leu Gln Gly
 275 280 285

Arg Thr Val Ala Asp Asn Gly Asp Asn Trp Asp Gln Asn Leu Leu Gln
 290 295 300

Leu Thr Tyr Pro Asn Gly Ala Ser Tyr Asp Pro Thr Asp Glu Val Pro
 305 310 315 320

ES 2 398 413 T3

Ala Pro Leu Gly Thr Gln Asp Phe Ser Gly Met Leu Tyr Gly Val Leu
 325 330 335

Thr Gln Asp Asn Val Asn Val Ser Thr Gly Glu Ala Lys Asn Ala Lys
 340 345 350

Gly Ile Tyr Ile Ser Thr Thr Ser Gly Lys Phe Thr Pro Lys Ile Gly
 355 360 365

Ser Ile Gly Leu His Ser Ile Thr Glu His Val His Pro Asn Gln Gln
 370 375 380

Ser Arg Phe Thr Pro Val Gly Val Ala Val Asp Glu Asn Thr Pro Phe
 385 390 395 400

Gln Gln Trp Val Leu Pro His Tyr Ala Gly Ser Leu Ala Leu Asn Thr
 405 410 415

Asn Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu
 420 425 430

Phe Phe Arg Ser Arg Val Pro Cys Val Gln Gly Leu Gln Gly Gln Asp
 435 440 445

Ala Phe Ile Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Asn His Phe Tyr
 450 455 460

Gln Glu Ala Ala Pro Ser Gln Ala Asp Val Ala Leu Ile Arg Tyr Val
 465 470 475 480

Asn Pro Asp Thr Gly Arg Thr Leu Phe Glu Ala Lys Leu His Arg Ser
 485 490 495

Gly Phe Ile Thr Val Ser His Thr Gly Ala Tyr Pro Leu Val Val Pro
 500 505 510

Pro Asn Gly His Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser
 515 520 525

Leu Ala Pro Met Gly Thr Gly Asn Gly Arg Arg Arg Ile Gln
 530 535 540

<210> 10
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP

ES 2 398 413 T3

<400> 10

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Asn Leu Val Pro Glu Ala Asn Asp Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val
 20 25 30

Val Gly Ala Ser Ile Ala Ala Pro Val Val Gly Gln Gln Asn Ile Ile
 35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Glu Asn Phe Val Gln Ala Pro Gln Gly Glu Phe
 50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Met Leu Leu Asn Leu Glu
 65 70 75 80

Leu Gly Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ser Arg Met Tyr
 85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Met Gln Val Gln Val Val Leu Ala Gly Asn
 100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro His Phe
 115 120 125

Pro Val Glu Asn Ile Ser Ala Ala Gln Ile Thr Met Cys Pro His Val
 130 135 140

Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Leu Pro Asp
 145 150 155 160

Ile Arg Asn Arg Phe Phe His Tyr Asn Gln Glu Asn Thr Pro Arg Met
 165 170 175

Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Ser Gly Glu
 180 185 190

Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ala Pro Asp
 195 200 205

Phe Glu Phe Thr Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr Lys
 210 215 220

Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Leu Gly Glu Leu Ser Asn Ser Arg

ES 2 398 413 T3

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

ES 2 398 413 T3

Ala Val Ala Leu Val Arg Tyr Val Asn Pro Asp Thr Gly Arg Asn Ile
 485 490 495

Phe Glu Ala Lys Leu His Arg Glu Gly Phe Leu Thr Val Ala Asn Cys
 500 505 510

Gly Asn Asn Pro Ile Val Val Pro Pro Asn Gly Tyr Phe Arg Phe Glu
 515 520 525

Ala Trp Gly Asn Gln Phe Tyr Thr Leu Ala Pro Met Gly Ser Gly Gln
 530 535 540

Gly Arg Arg Arg Ala Gln
 545 550

<210> 11

<211> 541

<212> PRT

<213> Hu/NLY/Osaka 10-25/1999/JP

<400> 11

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Ser Asp Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Gly Leu Val Pro Glu Ile Asn Asn Glu Val Met Pro Leu Glu Pro Val
 20 25 30

Ala Gly Ala Ser Leu Ala Thr Pro Val Val Gly Gln Gln Asn Ile Ile
 35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Ala Gly Glu Phe
 50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asp Leu Glu
 65 70 75 80

Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr
 85 90 95

Asn Gly His Ala Gly Gly Met Glu Val Gln Ile Val Leu Ala Gly Asn
 100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Ile Pro Pro Gly Phe
 115 120 125

5

ES 2 398 413 T3

Pro Tyr Glu Asn Leu Ser Pro Ser Gln Ile Thr Met Cys Pro His Val
 130 135 140
 Ile Ile Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Phe Leu Leu Pro Met Pro Asp
 145 150 155 160
 Ile Trp Asn Asn Phe Phe His Tyr Asn Gln Gly Asn Asp Pro Lys Leu
 165 170 175
 Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ser Gly
 180 185 190
 Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Lys Pro Ser Pro
 195 200 205
 Asp Phe Glu Phe Thr Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr
 210 215 220
 Lys Gln Phe Ala Leu Pro Ile Leu Lys Ile Ser Glu Met Thr Asn Ser
 225 230 235 240
 Arg Phe Pro Val Pro Val Asp Val Met Tyr Thr Ala Arg Asn Glu Asn
 245 250 255
 Gln Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Val Thr Leu Asp Gly Glu Leu
 260 265 270
 Leu Gly Thr Thr Pro Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Lys Phe Lys Gly
 275 280 285
 Glu Val Ile Ala Lys Asn Gly Asp Val Arg Ser Tyr Arg Met Asp Met
 290 295 300
 Glu Ile Thr Asn Thr Asp Gly Thr Pro Ile Asp Pro Thr Glu Asp Thr
 305 310 315 320
 Pro Gly Pro Ile Gly Ser Pro Asp Phe Gln Gly Ile Leu Phe Gly Val
 325 330 335
 Ala Ser Gln Arg Asn Lys Asn Glu Gln Asn Pro Ala Thr Arg Ala His
 340 345 350
 Glu Ala Ile Ile Asn Thr Gly Gly Asp His Leu Cys Pro Gln Ile Ser
 355 360 365

ES 2 398 413 T3

Ser Ser Glu Ile Tyr Leu Thr Ser Pro Asn Ile Leu Arg Cys Thr Asn
 370 375 380

Pro Gln Pro Leu Pro Gln Ser Gly Leu Arg Gly Thr Ile Leu Ile Arg
 385 390 395 400

Ser Asp Asn Gly His Cys His Asp Met Val Gly Thr Ser Pro Thr Thr
 405 410 415

Pro Thr Trp Pro Gln Gln Trp Arg Arg Cys Ser Arg Gly Ser Asn Cys
 420 425 430

Cys Ser Ser Gly His Arg Tyr Pro Val Pro Val Val Met Asn Arg Val
 435 440 445

Thr Trp Ile Val Leu Ser His Lys Ser Gly Phe Ser Thr Ser Thr Arg
 450 455 460

Lys Leu Pro Gln Leu Asn Leu Arg Trp Pro Leu Ile Arg Phe Ile Asn
 465 470 475 480

Pro Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Ala Arg Leu His Lys Gln Gly
 485 490 495

Phe Ile Thr Val Ala His Thr Gly Asp Asn Pro Ile Val Met Pro Pro
 500 505 510

Asn Gly Tyr Phe Arg Phe Glu Ala Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser Leu
 515 520 525

Ala Pro Val Gly Thr Gly Lys Gly Arg Arg Arg Val Gln
 530 535 540

<210> 12

<211> 1638

<212> ADN

5

<213> Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP

<400> 12

atgatgatgg cgtctaagga cgcccaaca aacatggatg gcaccagtgg tgccggccag 60
 ctggaccag aggcaatac agctgagcct atatcaatgg agcctgtggc tgggagcagca 120
 acagctgccg caaccgctgg ccaagtlaat atgattgacc cctggataat gaataattat 180
 gtgcaagccc ctcaaggatg attaccata tgcctaata acacaccagg tgatatittg 240
 ttgatctac aattaggccc tcatctcaat ccilicttat cccattggc ccaaatgtat 300
 aacggttggg ttggcaatat gaaagtgaag gtccatttgg ctggtaatgc cttcacggct 360

ggtaaaalaa lcattagtlg calaccccc ggctttgctg cgcaaaacat ttctatcgt 420
 caggccacaa lgtlccccca cglalagct gatgllagg lttlggaacc lattgaggtg 480
 ccaltggaag atgtgaggaa tglgclgttc cataacaatg acaacgcacc aaccatgagg 540
 ttggtgtgca lgtclacac cccctlgca gccagtgga gctcatctgg aactgacct 600
 lttgtgaltg ctggcggtg lclgacatgc ccaagccctg acttttagctt cttattctlg 660
 gtlccccca atglagagca aaagacaaa ccttttaglg tcccaaatct tccactgaat 720
 acccttcaa attcaagagt cccctccta attaaatcaa tgaatgatac cagagacat 780
 gggcagatgg ttcagtltca aaacgtagg gtcacctgg atgggcaact gcaaggcacc 840
 acgcccacat cagclagcca gctgtgcaa atcagaggca gtgtcttcca tgcataatgt 900
 gggatggat ataacciaac tgaatggat gggagcccat accatgcttt tgagagccct 960
 gcgccaatag ggtttcctga tclaggtgaa tgtgattggc acatggaggc cccccctacc 1020
 acccaattca ataclggtga lgtlataaaa caaaitaatg tcaacaaga atcagcattt 1080
 gclccccacc ttggtacct acaagcagat ggcttgatg atgtgagtgt caacactaac 1140
 atgatagcca aattgggatg ggtgtcacc gtcagtatg gacatagagg agatgtcat 1200
 ccglgggca tccacagata tgggtcact ttgaccgagg ccgccaatt agcccccca 1260
 atatacccc caggttttgg tgaggccatt gtgttttca tgcagattt tctatagcc 1320
 catggtacca atggcttag tlgccttgc accatacccc aagaatttgt caccatltt 1380
 gtcaatgaa aggccctac tagaggggaa gcagccclac tgcattattt agaccctgat 1440
 accatagaa atcttggta gtttaaita taccctgagg ggttcatgac gttgtgctt 1500
 aatccagtg gcactggctc acaaacctc ccaatcaatg gtgttttgt tttgtgtcc 1560
 tgggttcca gattctatca gttaaagct gtgggaacag ccggccggc ttgttagctt 1620
 ggcatcagaa gatcataa 1638

<210> 13

<211> 1593

<212> ADN

<213> Hu/NLY/Seto 124/1989/JP

<400> 13

atgatgatgg cgtctaagga cgtctagca agcgtggatg gcgccagtgg cgctggtcag 60
 ttgtaccgg aggttaatgc tctgacctt ctgcaatgg atcctgtggc gggttcttca 120
 acagcagttg caactgctgg gcaagtiaac cctattgacc ctggataat caataacttt 180
 gtgcaggctc cccaaggta attactatt tclccaaata atacccccgg tgggttttg 240
 ttgatttga gcttaggccc tcatctaat ccttcttgt tacatttgc acaaatgat 300
 aatggctggg ttggcaacat gagagttagg attatgctgg ctggtaatgc atttactgca 360
 ggcaaaaita lagttcttg calacctct ggctttggct cccataatct tactalagca 420
 caagcaactc lcttcccga tglattgct gatgttagga ctllagacct aattgaagta 480
 ccttgggaag atgtaaggaa tltctcttt calaataatg atagaaatca acaaacatg 540
 cgccttgtgt glatcttla tccccctc cgcactggg gcggtacagg tgattcttt 600
 tgggttcag ggcgagtcac gacttgcct agccccgatt tcaatttctt gtcttggtt 660
 cclcccacag lggaacagaa gactaggcct tlcacctcc caaatttacc gctgagttct 720
 ttgtcaaat cactgtctc tclccaatl agtggcaltg gtatttccc agacaatgtt 780
 cagagtgctc agttcaaaa tggcagatg accttagac ggcgtctgt lggtagcacc 840
 ccagtttccc tclcccagt lgtlaagata aggggcaact claatgttac tgtgatcaat 900
 ctaccgaat lggatggcac cccctccac ccttttgaag gcccggccc lattgglttt 960

5

ccagalcitg gggcigtga tiggcalatt aalatgacac aatttggca ticcagtcag 1020
 actcaatatg atgtagatac caccctcgac accttcgtcc ctcacttagg ticaatccag 1080
 .gccaalgga ttgtagtgg caactatatt ggtgttctta gctgggtctc cccccatca 1140
 catccalcig gctclcaagt tgalctctgg aagatcccca aciatgggtc tagcalcaca 1200
 gaggcaaccc atctagctcc ctctgtctat cctcciggct ttggagaggt gttagtcttt 1260
 ttcaltgcaa agataacctgg tccigtgtct talagtctgc cctgtttact gccacaagaa 1320
 tatactcac acctcgcaag tgaacaagcc cccactgttg gtagggccgc ctgtctccac 1380
 tatgttgacc ctgacacggg cgggactctt ggggagtta aggccttacc tgalgtttc 1440
 ctaacctgtg tccctaaccg ggcagctcg gcccacaac aactaccaat caatggagtc 1500
 tttgtctttg tttcatgggt gtccagatt taltcagtaa agcctgtggg aactggcagt 1560
 tggcaagag gtaggcctgg tttgcgccga taa 1593

<210> 14

<211> 1641

5

<212> ADN

<213> Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP

<400> 14

atgatgatgg cgtclaagga cgcccccaa agcgcigtat gcgcaagcgg cgcaggtcaa 60
 ctggigccgg aggttaatac agctgacccc ttaccatgg aaccgtggc tggccaaca 120
 acagccgtag ccactgctgg gcaagtaat atgattgac cctggattgt taataatctt 180
 gtccagtcac cacaaggtga gttacaatt tcccctaata ataccctgg tgalattttg 240
 tttgatttac aattaggtcc acatclaaac ctttcttgt cacalctgtc ccaaatgtat 300
 aatggctggg ttggaacat gagagttagg attctccttg ctgggaatgc atctcagct 360
 ggaagatta tagtttgtg tgcctccctt ggctttacat ctctctctc caccatagct 420
 caggctacat tgtttcccca tgtattgct gatgtgagaa ccttgaacc aatagaaatg 480
 cccctcgagg atgtacgcaa tgcctctat cacaccaatg ataataacc aacaatggcg 540
 ttggtgtgta tgcctgacac gccgctccgc actgggtggg ggtctggtaa tctgtattct 600
 .tttgggttg ctggcaggtt gctcacggcc cctagtagcg acttcagttt ctgttccctt 660
 gtcccgccta ccatagaaca gaagactcgg gctttactg tgcctaatal ccccttcaa 720
 acctgtcca attctaggtt tctttccctc atccagggga tgaattctgt tctgacgca 780
 tctcaagtgg tccaaltcca aaatggacgt tgcctatag atggtcaact cctaggcact 840
 acaccgcta catcaggaca gctgtcaga gtaagaggaa agataaatca gggagccctg 900
 acgctcaacc tcacagaggt ggalggcaaa ccatlcatgg catttgattc cctgcacct 960
 gtgggttcc cggattttgg aaaaigtgat tggcacatga gaatcagaa aaccccaat 1020
 aacacaagct caggtgacct calgcgcagt gtcagctgc aaaccaatgt gcagggtttt 1080
 gtgccacacc taggaagtat acagttgat gaaglttca accacccac aggtgactac 1140
 attggcacca ttgaatggat tcccagcca tctacacccc ctggaacaga tattaatctg 1200
 tgggagattc cggattatgg atcatccctt tccaagcag ctaacttggc cccccagta 1260
 tcccccttg gatttggta ggtcttltgt tactttgttt ctgctttcc aggcccaac 1320
 aaccgctcag cccgaaalga tglacctgt ctctccctc aagaglacat aaccacttt 1380
 gtcagtgaac aagcccaac gatgggtgac gcagcttgc tgcattatgt cgacctgat 1440
 accaacagaa accttgggga gtccaagcta taccctggag gttacctcac ctgtgtacca 1500
 aacgggttgg gtgccgggcc tcaacagctt cctctaatg gtgtcttct ctltgtctct 1560
 tgggtgtctc gttttatca gctcaagcct ggggaacag ccaglacggc aagaagtagg 1620

cttggagigc gccglalala a

1641

10

<210> 15

<211> 1635

<212> ADN

<213> Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP

<400> 15
 aigalgalgg cgtciaagga cgctacacca agcgcagatg gcgccactgg cgccggccag 60
 ctggilaccgg aggtlaatac agctgacccc atacctatlg accctlggce tggctcctct 120
 acagccctlg ccacagcagg ccaggtaat ttgattgatc cctggataat caataatit 180
 gtgcaagccc cccagggcga gttcacaata tccccaaata atacccccgg tgatgtgctt 240
 ttigtattgc aattaggacc ccattlaaat cctttccttt cccacccttc tcagatgat 300
 aatggttggg tgggcaacat gcgagtcgtt gttgtctigg ctggtaatgc tttcacggct 360
 gggaaaggta taattgttg tgtccccctt ggtttccaat ctgcaccct tcttatagcc 420
 caggctactt tatttcccca tgaattgctt gatgttagga cccctgacce tglagaagtg 480
 ccccttgaag atgttaggaa tgtgttgiat cataataatg acaccaacc caccatgcgc 540
 ctcttttga tgtgtacac tctctccgc accgggggag cgtctgggtg gactgattct 600
 tttgtgggtg ctgggcgtgt actcacttgt ccgggccctg actttaactt cttattccta 660
 gtccctccca cagtcagga aaagaccgc ccttttactg tgcctaataat cccittgaag 720
 taccgtctta atccaggat cccaaatcct attgaagta tgtcatgtc acctgaccag 780
 acccaaaaat tcaattcca gaatgglagg tglacaatg acggtaacc ccttgggacc 840
 acaccgtctc cagttagta gttatglaag tttagggta ggattacac tggacagaga 900
 gtgtcaactt tgacagagtt ggaatgta ccttttalgg cctttgccgc ccccgcccct 960
 gcgggcttcc cagatcttgg gtctctgat tggcataatg aaatgagtaa aatcccaaat 1020
 tccagcacc agaacaacc aatagtgacc aatctgtca aaccaatag tcaacagttt 1080
 gtcccacact tgtcaagta caccctgat gaaaatgltt ccagttggagg tgactatatt 1140
 ggcactatac aatggacctt acctccttct gatcttggcg gggccaatac aaatttttgg 1200
 aaaatccctg actatgggtc cagcctagca gaagcttcc aactggccc cgctgtctat 1260
 ccacctggtt tcaatgaggt gattgtgtat ttatggcat ctatacctgg tccaatcag 1320
 tctgggtctc ctaatttagt gccatgctg ctccccagg aatatatac acactttatt 1380
 agtgagcagg ccccatcca ggtgaggct gccttactcc actatgtaga ccagacacc 1440
 aatcgcaatt tgggtgagtt caaattata cctgggtggtt atttaacctg tgttccaat 1500
 agttctagta ctggacctca acaacttctt ctgatgggt tatttgtctt tgcctcttgg 1560
 gttcttagat ttatcaatt aaagcctgtg ggaacagccg gaccggctag aggtaggctt 1620
 ggtgtccgta gataa 1635

<210> 16

<211> 1620

<212> ADN

<213> Hu/NLV/Narita 104/1997/JP

<400> 16

atgaagalgg cgtcgaalga cgccaaccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca 60

5

gaggicaaca atgaggitat ggcttggag cccgttgttg gtgccgctat tggggcacct 120
 gtagcgggcc aacaaaatgt aattgacccc tggattagaa ataattttgt acaagcccct 180
 ggtggagagt ttacagtat ccctagaaac gctccgggtg agalattatg gagcgcgcc 240
 ttggcccctg aittgaacc ctacctttct calttggcca gaaltacaa tggitatgca 300
 ggtggttttg aagtcagggt aatcctcgcg ggaacgcgt tcaccgccgg gaaaalcata 360
 ttgacagcag tcccacaaa tttccaact gaaggcttga gcccagcca gtttactatg 420
 tcccccala laalagtaga igttaggcaa ttggaacctg taitgatccc ctacctgat 480
 gttaggaala acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca 540
 atgctgtata caccacttag ggctaataat gctggggatg atgctttcac agtctcttgt 600
 cgagcttca cgaggccatc ccccgatitg gatttcatat tcttgggtcc acccagctt 660
 gaalcaagaa cttaaccatt caccgtccca atcttaactg ttgaggaat gtctaactca 720
 agattcccca ttcttttga aaagttgtac acgggtccca gcagtgcttt tgttgcctaa 780
 ccacaaaatg gcaggtgcac gactgatggc gtgctcttag gcaclacca gctgtctgt 840
 gtcaacatct gcacctcag aggggatgtc acccacttg caggcagica tgaclataca 900
 atgaatttgg ctctcaaaa ttggagcaat taigaccaa cagaagaaat cccagcccc 960
 ctgggaactc cagatttctg ggaagatc caaggcatc tcaccaaac cacaagagag 1020
 gatggctcga cccgcgccca caaagctaca gtgagcactg ggagtgtcca ctctactca 1080
 aagctgggca gtgttcaata caccactgac acaacaatg atttcaaac tggccaaaac 1140
 acgaaatca cccagtcgac cgtctccag gacggtaata atcaaaaa tgaacccca 1200
 caatgggtgc tcccaaatla ctgagtaga actggtcata atgtcacct agctctgtcc 1260
 gttccccca ctctccggg ttagcaactt ctctcttta ggtcactat gcccggatgt 1320
 agcgggtatc ctaacatgaa tctggattgc ctactcccc aggaatgggt gcaacactc 1380
 tccaagaag cagctccagc acaatctgat gtggctctgc tgagatttgt gaatccagac 1440
 acaggtaggg ttttggttga gtgcaagctc cataaatcag gctatgtcac agtggctcac 1500
 actggccgc atgatttgg tttcccccc aatggttact ttgatttga ctctgggtc 1560
 aaccagtct acacacttgc ccccatggga aatggagcgg ggccagggc tgcattataa 1620

<210> 17

<211> 1647

<212> ADN

<213> Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP

<400> 17

atgaagatgg cgtcgaatga cgtctctcca tclaatgatg gtgccgccgg cctctctcca 60
 gagatcaaca atgaggcaal ggcgctagac ccagltggcg gtgcagcga atgacgcgcc 120
 ctctactgtc agcaaaacat aattgatccc tggattatga ataattttgt gcaagcacct 180
 ggtggtagt ttacagtgtc ccctaggaat tcccctgtg aagtgcttct taatttggaa 240
 ttggcccag aaataaacc ttatttggcc catcttctga gaaltataa tggitatgca 300
 ggtggatttg aagtcagggt ggtcctggct ggaatgcgt tcacagcagg aaagataatc 360
 tttgcagcta taccctctaa tttccaatt gataatctga ggcagcaca aatcaclatg 420
 tccccgatg tgatttggga tctcagacag ttggaaccgg tcaaccttcc gatgcttgc 480
 gttcgcaaca atttcttca ttacaatcaa ggtctctgatt cgcgattgag cttaatttga 540
 atgctgtata cacccttag ggcaataat tctggagatg atgtttcac tgtgtcttgt 600
 agagtactga ctaggcctag cccgatitg tcaatcaat tccctgtccc acccagctg 660
 gaalcaaaaga caaaacctt taccctccct atctgacta tctctgaaat gtccaattct 720

5

aggltccag igccgaliga giclllgcac accagcccaa ctgagaatat lgtlgtccag 780
 tgccaaaatg ggcgcgtcac lcicgatggt gagltgatgg gcaccacca actcttaccg 840
 aglcaaaatt gtagcilltag ggcggtgctc accagatcaa caagcagggc caglgatcag 900
 gccgatacag caacccttag gctglitaaat tattatlggc atgtacaatt ggalaatcta 960
 aatgggaccc ctlatgatcc tgcagaagac ataccaggcc ccctagggac accagacttc 1020
 cggggcaagg tctllggcgt ggccagccag agaaacctcg acagcacaac tagagcacaat 1080
 gaagcaaaag tggacacaac agctggctgt tcaccccaa agttgggctc attagaata 1140
 tctactgatt ccgatgactt tgaccaaaac cagccaacaa agttcacccc agttggcatt 1200
 ggggttgaca atgaggcaga atticagcaa tggctcttac ccgactatc tggtcagttc 1260
 acccacaaca tgaacctggc cccagctgtt gctcccaact tcccgtgta gcagctcctt 1320
 ttcttccgt cacagtlacc atctctggt gggcgatcca acgggtcct agactgtctg 1380
 gtccccagg aatgggtcca acactctac caggaaatcg cccccccca aacacaagtg 1440
 gccctggta ggtatgicaa cctgacact ggtaaagtgc tatttgaggc caagctgcat 1500
 aaataggtt ttatgactat agctaacaat ggtgatctc caataactgt tcccccaat 1560
 ggatattta ggtllgaatc ttgggtgaac ccttttata cacttgcccc catgggaact 1620
 gggaaacggc gtagaaggat tcaataa 1647

<210> 18

<211> 1623

<212> ADN

<213> Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP

<400> 18

atgaagatgg cgtcgaatga cgctactcca tctaattgatg gtgccgccgg cctcgtgcca 60
 gaaagtaaca atgaggcaat ggctctggaa cccgtgtggt gggcgtcttt agccgcccct 120
 gtcactggcc aaactaatat aatagacccc tggattagaa ctaattttgt ccaagcccc 180
 aatggtgaat ttacagtttc ccttagaana tcccctggag agatatlgt caattlggag 240
 ttgggtccag aactgaaccc ttatctggca catttagcta ggatgtacaa lggttatgca 300
 ggtggatagg aggtgcaagt galgtcgcg gggaaacgct tcaactgtgg caagatcacc 360
 ttggccggcg tggcaccfta ctctccagt gaaaactta gcccttcca aataacaatg 420
 ttcccacatg tcatcatega tgcagaacc ttggaacctg tattactccc aatgcctgat 480
 gtcagaagca ccttttcca cttaataca aaagatgagc claagatgag actgtgtgcc 540
 atgctttaca cccccctcg ttctaattgt tctggtagc acgtttcac cgtctcatgt 600
 aggatctca ctaggccctc cctgaattt gatcttacc atttgggtgcc accaacagta 660
 gaatcaaaaga ctaagccatt cacactacct gtctgacac tgggagaact gtccaactct 720
 agattccctc tctctatiga tgaalggtc accagcccaa atgagttcat agtlgttcag 780
 ccacagaatg gtagggctac actagatggg gagctgttag gcacaacca actgcaagca 840
 tgaacattt gctccataag ggggaaggta acagggcagg tcccctagtga acaacacatg 900
 tggaaacctg agatcacaaa cctaaatggg acgcaattg accctacaga tgalgtcca 960
 gccccctlg gltgcccga ctllgcaggt gaggtctllg gttgtactcag ccagagaaat 1020
 agaggtagaa gcaacccagc aaacaggctc calgacgctg tctgggttac ctacagtac 1080
 aagtacacc ctaaacctagg cttagtgcaa atlggaaacti ggaacaccaa tgaatgtga 1140
 aaccagccaa caaaatcac ccaatlggt tgaatgagg tgcctaatgg ccalcgattt 1200
 gaacagtgga ctllgcctag gtaactggtt gccttgacat taaalatgaa tllagcccct 1260
 gctgtggccc cgtctcttc tggagagcgt ctcttttct tccgtctta tgtcccatla 1320

aaaggtagat ttggaaaccc tgctatagat tglctgggtc ctgaggagtg ggtccaacat 1380
 ttctatcagg aatctgcccc ttctctgggg gatgtggcct tagltaggta cgtcaacca 1440
 gacaccgggc gcgtctttt cgaggccaaa ctccacaaag gtgggttctt gactgtgtct 1500
 aglactagca caggccctgt tgtggttcca gccaatggct atttcaaat tgaatccttg 1560
 gttaatcaat ttactctct tgcctccatg ggaactggaa atgggcgtag aagggttcag 1620
 taa 1623

<210> 19

<211> 1608

<212> ADN

<213> Hu/NLY/Chitta 1876/1996/JP

5

10

<400> 19

```

algaagalgg cgtcgaatga cgccgcacca tctaatagat gtcagccgg tctgtacca 60
gaggctaaca atgagacat ggcactlgaa ccggtggctg gggcttcaat agccgcccc 120
ctcaccggcc aaaacaatat tatagacccc tggattagat taaatlttgt gcaggctccc 180
aatggagagt tcacggtttc accccgcaac tcaccgggg aagtcctatt aaatttggaa 240
ttaggccccg aactaaatcc atacctagca caccitttca gaatgtataa tggttatgca 300
ggtaggggtg aggtgcaagt actactggct gggaatgctg tcacagctgg aaaattgggtg 360
tttcccgag ttccccca ttttccatta gaaaacataa gccctggta gataactatg 420
tttcccatg taattattga tgttaggact ttagaaccag tttgttggc ctttctgat 480
gttaggaata atttcttca ttataatcag cagaatgaac cgaggatgag actcgtagca 540
atgcttata ctcccttag atctaaggt tctggtgatg atgtattac tcttctctgc 600
agggtgctta cccgaccttc cctgatltt gatlttaatt acttggctcc ccttacctt 660
gaatcaaaa ctaaaacctt cacactcctt atcttgacta taggggagtt aaccaactcc 720
aggctccctg tgcctataga tgagctctac accagcccc atgagagtct ggtggtgcaa 780
ccccagaacg ggagatgcgc gctagalggg gagctacagg gcacgactca gctctcccc 840
acggcgaltt gctcgttcag gggccggatc aatcaaaaagg igagtgaga aaacatgtt 900
tggataatgc aggtcaccaa catcaacggg accccttttg atccaacagg ggatgtccc 960
gctctctag gaacccaga ttctctggc aagctctttg gigtactaag ccagagagac 1020
catgataatg cctgtaggag tcatgalgca gtaattgcaa ccaactctgc caattcact 1080
ccaaaatigg gcgctataca aattggcaca tgggaagaag acgatgtgca catcaacca 1140
cctactaagt ttactccagt tggcttgttt gaaaatgaag gtttcaacca gtagacactc 1200
cccaattatt ctggagcctt aacactaat atggggttgg cccctctgt ggccccacc 1260
ttccctggtg aacaattct tttctllaga tcccacatc ctctlaaagg aggtgtggcg 1320
gaccagtta ttgatgtct ctggcctcaa gagtggatcc aacatcttta ccaagagtcg 1380
gccccctcac aatcagatgt agcattgatt aggtttacaa atccagacac aggacgtgtt 1440
ctalltgaag caaaatlaca caggagtggt tacattacag tggccaatc tggtagcaga 1500
ccgalttgg taccagctaa tggttacttc aggtttgata ctgggtcaa tcaattctat 1560
tctctgccc ccatgggaac tggaaalggg cgtagaaggg ttcagliaa 1608

```

<210> 20

<211> 1629

<212> ADN

<213> Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP

<400> 20

algaagalgg cgtcgaatga cgccgctcca tcaaatgatg gfgcagctag tctcgtacca 60
 gagggcatta atgagactat gccattggaa cccgttctcg gcgcatctat tctcgtacca 120
 gtggcgggac aaaccaacat aattgacccc tggataagaa caaattttgt acaagccccc 180
 aatggagagt ttacagtgtc accaagaaat tccccggag aaatttttatt aaattlagaa 240
 itaggaccag atcigaatcc ttatttggcc catctttcaa gaatgtacaa tggttatgct 300
 ggaggigtgt aggtgcaagt gctccttgcg gggaacgctg tcacagcagg taagatattg 360
 tttgcagcaa tcccacctaa ctctctcgta gatatgatta gccagctca aattactatg 420
 ctccccatt tgattgtaga ttttaggact ttggaacctt ttatgacacc ctgtcctgat 480
 gtttagaatg ttttctatca ttttaataa caacctcaac ctagaalgag gtttagtgct 540
 atgtcttaca cccattggag gtctaatgtt tcaggagatg atgtcttcac tgtgtcttgt 600
 agagtaclaa ctaggccaac tccctgattt gaattttatt accctgggcc ccttctgta 660
 gagtccaaaa cttaaccatt cacactacca atattaacca tttctgaatt gaccaactcc 720
 cggctcccca tccaatcga gcaattgtat acggctccaa atgaaacca tgttctccag 780
 tctcagaatg gcaggctcac cttagatgga gagctccagg gcacaacca gctgttatca 840
 agtgcagitt gcttcttaca ggccaggact gtggctgata atggggataa ttgggacca 900
 aatttgcicc agctgacctt tccaatgtt gcaagctatg accccactga tgaagtcca 960
 gcaccattgg gcactcagga ttttagtggg atgttctatg gagtctgac ccaggacaat 1020
 gtagatgta gcacaggaga ggccaaaaat gctaagggaa tatacatatc caccactagt 1080
 ggaaaatca ccccaaaaat tgggtcaatt ggattgcatt caataactga gcatgtcac 1140
 cccaaccaac agtctcgggt caccctcctc ggagctcggc tggatgagaa caccctctc 1200
 cagcaatggg tctcgcaca ttaigcaggt agtctcgtc tcaacaccaa ttggcacct 1260
 gctgttggcc cgactttccc tggtagcaa ttgtgttct tcaggctccg tctccatgt 1320
 gttcaaggcc tacagggaca ggatgcgttc atagattgcc tcttcccca agagtgggtg 1380
 aatcatttt accaagagge agcccttcc caagcagac ttgcccttat taggtatgtc 1440
 aacctgata ccgctcgcac gctgtttgaa gccaaattgc atagatcagg ttttattact 1500
 gtgtcacata ctggctctta cctcttctga gtcccccaa atggtcattt caggtttcat 1560
 tcttgggtta atcaatttla ctacactgcc cccatgggaa ctggcaatgg gcgtagaaga 1620
 attcagtaa 1629

<210> 21

<211> 1653

<212> ADN

<213> Hu/NLY/Mie 7k/1994/JP

<400> 21

atgaagalgg cgtcgaatga cgctgcctcca tcaaatgatg gfgctgcaa cctcgtacca 60
 gagggccaac atgaggttat ggcaatlgaa cccgttctcg gagcccaat tgcagctcct 120
 gttgtcggcc agcaaaaat aattgacccc tggattagag aaaattttgt ccaagcacca 180
 caaggtagt tcaactgttc accaaggaat tcccttggcg agatgctctt aaaccttgag 240
 ttgggeccag aacttaatcc ctatttaagt calltgcctc gcatgtacaa cggatattgt 300
 ggtggcatgc aggttcaggt ggtcctagct gggaatgctg tcacagctgg gaaaatcctc 360
 tttcccgccg tgcaccaca ttccccgta gaaaacatca gtcagccca aataactatg 420

5

tglccccatg lgattgilga tglgagacaa cltgaaccag lgcctctgcc cctccctgat 480
 ataaggaata ggctctcca ctacaaccag gagaacaccc cccggatgag gcttctagcc 540
 atgctctata caccctlaag ggctaactct gglgaggatg tallcactgt gtcctgcagg 600
 gtlctgactc gccccgccc agattttgag ttcacatltt tagtccacc aactgtttaa 660
 tcaaaaacaa aaccctttac tttacctatc tlgactcttg gcgagtgtc taattctgcg 720
 tttccggctg ctatagatat gctttatacl gaccctaagc aatcaatagt tgtacaacc 780
 caaaatggta ggtgcaccct tgatggtaca ttgcaaggca caacacaait ggttcccaca 840
 cagatctgig cttllagagg cacctgatc agccagaccg cgagagcggc cgaltcaaca 900
 gatcccccc agagagcccg laatcatcca ctgcacgicc aagttaaaga cctagacggt 960
 acacaatatg acccaacgga cgatalaccj gcagctcigg gggctattga ctcaaaagg 1020
 acagctcttg gagtggctag tcagagggat gttctcggac aacaagaaca gggccactat 1080
 gccaccggag cccatgaagc acacatcgac acaactgatc caaagtatgc acccaatta 1140
 ggcacaattc lcatlaaalc tggttctgat gatttcaata caaaccagcc cattagattc 1200
 actccggctg gcatgggtga caacaattgg agacaatggg aattgccga ctattctggc 1260
 agaltaacct taaatataaa ccttgcctct gctgtttctc catctttccc tggtaacga 1320
 atccttttct tcaggtccat agtaccatca gccggaggct acgggtctgg ctacatagac 1380
 tgtctcatal cccaggaatg ggtgcagcac tttaccagg aagcagcacc ttcacaatct 1440
 gctgttgcac tggtaggta tgtcaacccc gatactgggc gtaacatctt tgaggccaaa 1500
 ctgcacagag aagggttctt caccgtggcc aactgtgtaa acaatcctat ttagtctccc 1560
 cccaatggct atttcagait tgaggcttgg gtaaatcagt tttataact tgcctccatg 1620
 ggaictggac aggggcctag aagggccag taa 1653

<210> 22

<211> 1626

<212> ADN

<213> Hu/NLY/Osaka 10-25/1999/JP

<400> 22

atgaagalgg cgtcgaatga cgcagctcca tctagtgatg gtcgagcagg cctcgtacca 60
 gagatcaaca atgaggctcat gccccitgaa cccgtggctg gtcgactcgt ggcgacacca 120
 gtcgctgggc aacaaaatat aatlgatccc tggataagaa ataatittgt gcaggctcct 180
 gcaggctgagt ttactgtttc ccttaggaat tcccctggag aaattttgct tgatttggaa 240
 ttgggaccag atttgaatcc ctacclagcc catctggccc gcatgtataa tgggcacgct 300
 ggcggcatlg aagtgcfaat tgtcctggct gggaaatgct tcacagcagg caaaatcata 360
 tttgctgcca tccccccagg gttccatata gaaaatttgt cacctctca aattacaatg 420
 tgcacacatg ttataatiga tgltaggcaa ttggagccat tctttllgcc tatgccagac 480
 atttgggaata atttcttcca ttataatcag ggcaatgatc caaaallgag gctagtgtct 540
 atgctctata ctcccttgag ggctaataat tctgggtgat atgtgttcac agtttcttgt 600
 aggggtgcca caaaaccttc acccgacttt gaattccat tictagttcc cccacagtc 660
 gagictaaga ctaagcaait cgtctlgccc attctcaaaa talcagagat gactaattca 720
 agatccccag taccagtgga tglgatgtac acggccagga acgagaacca ggtcgtccaa 780
 ccaagaaalg gcagggtcac actcgacggg gaactgttgg gcaccactcc cctgtlggct 840
 gttaacatct glaatttaa gggagaagtc atagccaaa atggggactg gagatcctat 900
 agaatggata tggaaatcac taacacigat ggaacaccta ttgacccac agaggacaca 960
 cctgttccca ttggctcacc agatttccag ggcatalctt ttggcgttgc cagtcagcgc 1020

5

ES 2 398 413 T3

```

aalaagaatg agcaaaacc cgccacgagg gctcatgaag ccataaltaa caciggtgga 1080
gaccatttat gcccccaaat tagctcaagt gaaattatc tcacaagtcc caacattttg 1140
aggigacca acccacaacc ttaccaccag tcggggtgc ggggacaat tctcatccgt 1200
tcagacaatg gacactgcca cgatctggig ggcacctcac caacaacacc cacctggccc 1260
cagcagtggc gccgctgtc cgggggagc aaltgctgtt cltcaggta cagataccca 1320
gtlccggigg tcatgaatcg cgttacatgg atlgtcttgt cccacaagag tgggttcagc 1380
acttctacca ggaagctgcc acagctcaat ctgaggiggc ccctcataag altcatcaac 1440
ccagacactg gtagggtcct tttgaggct aggctacata agcaaggctt cataacigtg 1500
gctcataccg gtgacaacc aattgtcatg ccaccaaatg ggtatttcag gttigaagct 1560
tgggtcaatc agttttatc acttgcccc gtgggaactg ggaaaggcg tagaagggtc 1620
caataa 1626
<210> 23
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<400> 23
aatgatgatg gcgtctaagg a 21
10 <210> 24
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<400> 24
15 tttttttt tttttttt tttttttt ttt t 33
<210> 25
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <400> 25
gccattatcg gcgcaracca agcc 24
<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <400> 26
tgacctcgga ttgtggacag 20
<210> 27
<211> 31
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<400> 27
gcgaattctt atctacggac accaagccta c 31
<210> 28
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<400> 28
gtgaatgaag atggcgtcga 20
<210> 29
40 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<400> 29
45 ccattataat gcacgcctgc gcc 23
<210> 30
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
50 <400> 30
ttgtgaatga agatggcgtc ga 22
<210> 31
<211> 24

```

ES 2 398 413 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<400> 31
5 aattattgaa tccttctacg cccg 24
<210> 32
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<400> 32
10 aattactgaa cccttctacg cccatttc 28
<210> 33
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <400> 33
ccataactga acccttctac gcc 23
<210> 34
<211> 24
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<400> 34
atgaagatgg cgtcgaatga cg 22

25

REIVINDICACIONES

1. Un kit de detección de SRSV que consiste esencialmente en:

- 5 (a) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 1 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 1, y
- (b) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 2, y
- 10 (c) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 3 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 3, y
- (d) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 4, y
- 15 (e) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 5 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 5, y
- (f) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 6 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 6, y
- 20 (g) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 7 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 7, y
- 25 (h) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 8 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 8, y
- (i) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 9 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 9, y
- 30 (j) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 10 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 10, y
- 35 (k) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 11 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 11.

2. Un kit de detección de SRSV de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos anticuerpos han sido preparados mediante la inmunización con partículas de tipo virus.

3. Un kit de detección de SRSV de acuerdo con la reivindicación 1, para distinguir los serotipos de los SRSV.

4. Un kit de detección de SRSV para discriminar el genogrupo de los SRSV, consistiendo esencialmente el kit en

- 45 (a) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 1 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 1, y
- (b) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 2, y
- 50 (c) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 3 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 3, y
- (d) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 4.

5. Un kit de detección de SRSV para la discriminación del genogrupo de los SRSV, consistiendo esencialmente el kit en

- 60 (e) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 5 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 5, y
- (f) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 6 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 6, y
- (g) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 7 o un

- anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 7,
y
5 (h) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 8 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 8,
y
(i) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 9 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 9,
y
10 (j) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 10 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 10, y
(k) un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 11 o un anticuerpo contra un péptido parcial del mismo que tiene una antigenicidad equivalente al péptido del SEQ ID NO: 11.
15
- 6.** Un kit de detección de SRSV de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en donde los anticuerpos se inmovilizan sobre portadores de anticuerpos en fase sólida adecuados para capturar los SRSV.
- 20 **7.** Un gen de Hu/NLV/Chiba/407/1987/JP que tiene
(a) una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 15; o
(b) una secuencia de bases que codifica un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 4.
- 25 **8.** Un gen de Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP que tiene
(a) una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 20; o
(b) una secuencia de bases que codifica un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 9.
- 30 **9.** Un gen de Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP que tiene
(a) una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 21; o
(b) una secuencia de bases que codifica un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 10.
- 35 **10.** Un gen de Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP que tiene
(a) una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 22; o
(b) una secuencia de bases que codifica un péptido con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 11.
- 40 **11.** Un anticuerpo anti-SRSV específico para partículas de tipo virus que consisten en el péptido del SEQ ID NO: 4, el SEQ ID NO: 9, el SEQ ID NO: 10 o el SEQ ID NO: 11.

FIG. 1

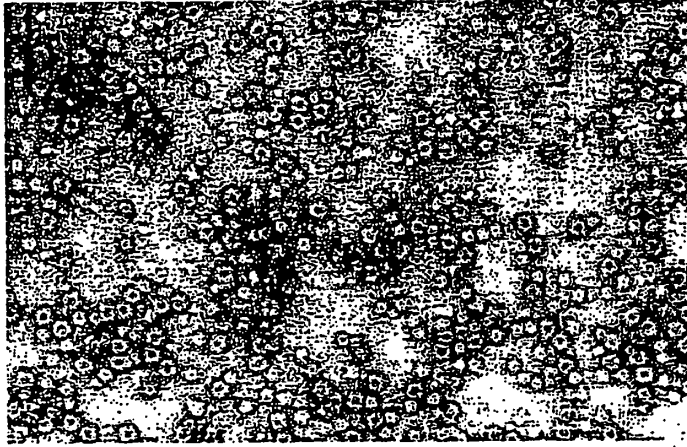


FIG. 2

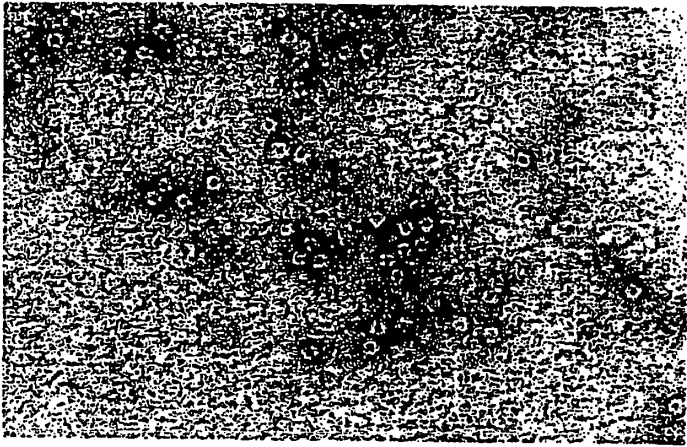


FIG. 3

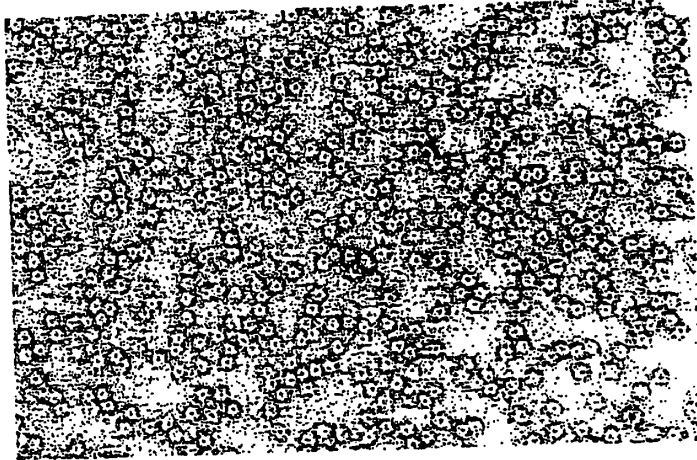


FIG. 4

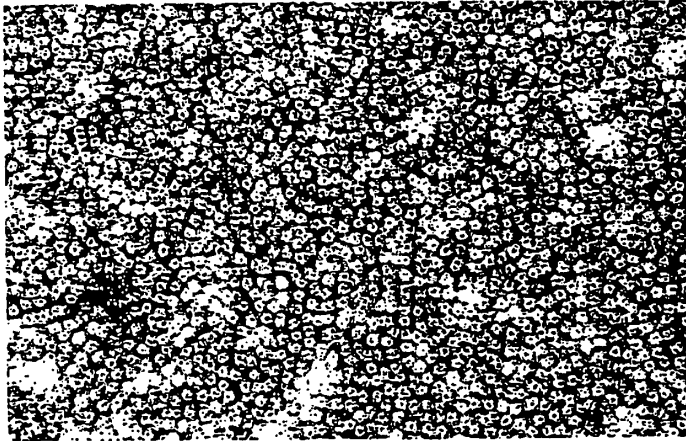


FIG. 5

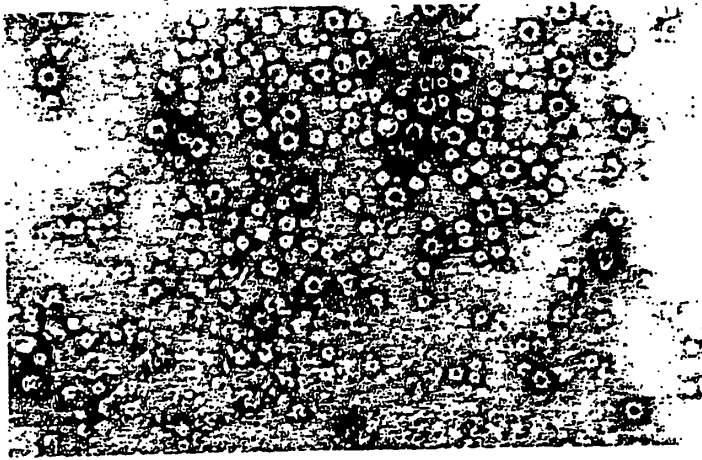


FIG. 6

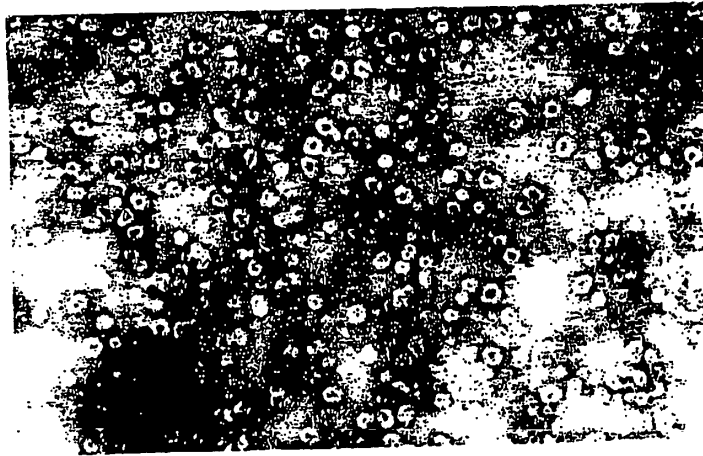


FIG. 7

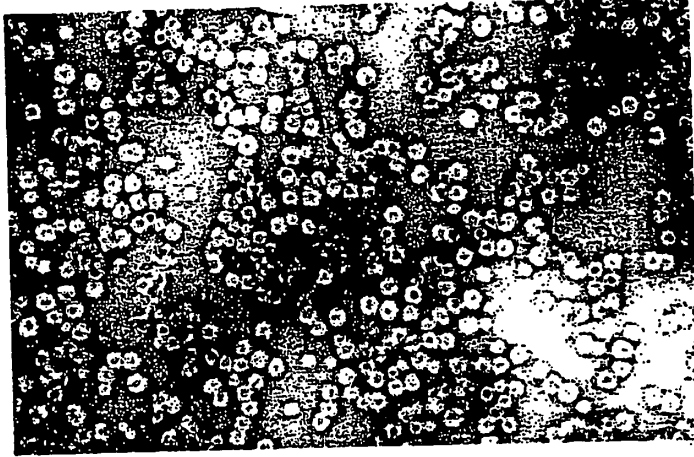


FIG. 8

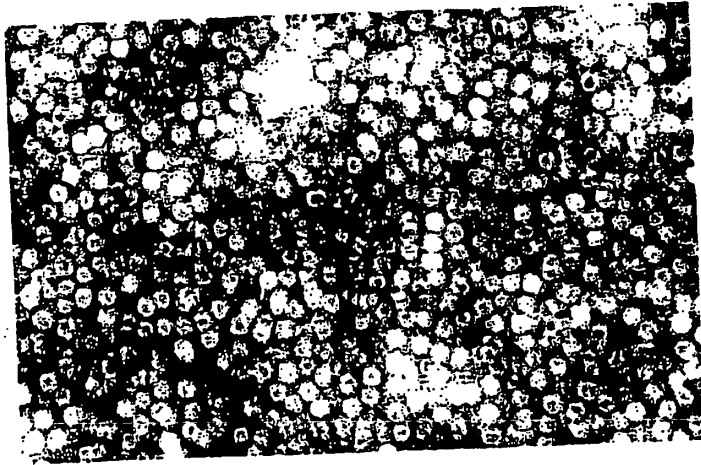


FIG. 9

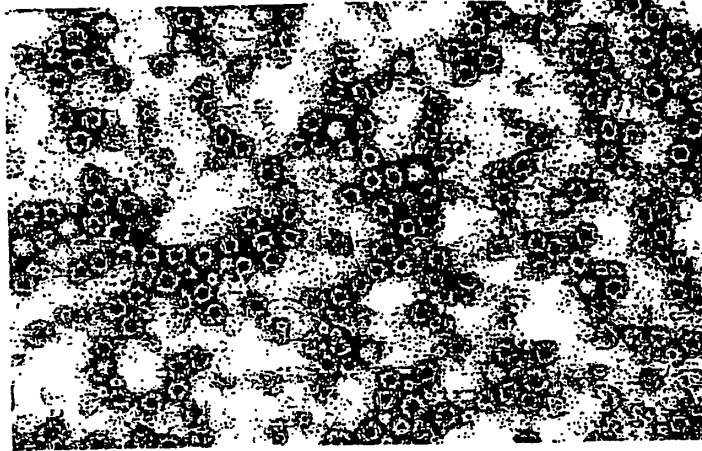


FIG. 10



FIG. 11

