

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 841**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010 E 10775152 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2430193**

54 Título: **Marcadores para la detección del cáncer gástrico**

30 Prioridad:

15.05.2009 NZ 57701209

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

07.09.2016

73 Titular/es:

**PACIFIC EDGE LIMITED (100.0%)
Anderson Lloyd, Level 10, Otago House, Cnr
Moray Place and Princes Street
Dunedin, 9016, NZ**

72 Inventor/es:

GUILFORD, PARRY JOHN

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 581 841 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

Marcadores para la detección del cáncer gástrico.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la detección del cáncer. De modo específico, esta invención se refiere al uso de un marcador de proteína para la detección del cáncer gástrico.

Antecedentes

10 La supervivencia de los pacientes con cáncer aumenta enormemente cuando el cáncer se detecta y se trata de forma temprana. En el caso del cáncer gástrico, los pacientes diagnosticados con la enfermedad en un estadio temprano tienen una tasa de supervivencia a los 5 años del 90%, comparado con aproximadamente 10% para los pacientes diagnosticados con la enfermedad avanzada. Sin embargo, la gran mayoría de los pacientes con cáncer gástrico en la actualidad se presentan con la enfermedad avanzada. Por tanto, los avances que conducen a un diagnóstico temprano del cáncer gástrico pueden conducir a una mejor prognosis para los pacientes.

15 La identificación de marcadores asociados al cáncer específicos en muestras biológicas, que incluyen fluidos corporales, por ejemplo, sangre, orina, lavados peritoneales y extractos de deposiciones pueden proporcionar una estrategia valiosa para el diagnóstico temprano del cáncer, que conducirían a un tratamiento temprano y una mejor prognosis. Los marcadores del cáncer específicos también pueden proporcionar un medio para controlar el avance de la enfermedad, que permitiría seguir la eficacia de tratamientos quirúrgicos, radioterapéuticos y quimioterapéuticos. Sin embargo, para una serie de cánceres importantes, los marcadores disponibles tienen poca sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, los marcadores que se emplean con más frecuencia para el cáncer gástrico, ca19-9, ca72-4 y el antígeno carcinoembrionario (CEA) detectan solo aproximadamente 15-50% de los tumores gástricos de cualquier estadio, disminuyendo hasta aproximadamente 2-11% para la enfermedad en estadio temprano. Por tanto, hay una frecuencia muy alta de ensayos falsos negativos que puede conducir a que los pacientes y los profesionales sanitarios crean que no existe enfermedad, cuando, de hecho, el paciente puede padecer un cáncer grave que necesite de una atención inmediata. Además, estos marcadores pueden producir señales de falso positivo en hasta 1/3 de los individuos afectados por una enfermedad gástrica benigna.

25 El documento WO 2005/010213 describe marcadores para la detección del cáncer gástrico. El documento WO 02/100336 describe proteínas de la membrana endotelial específicas de tejido. Liang *et al.* (Proceedings of the American Associate for Cancer Research Annual Meeting, vol. 46, abril, 2005, p. 452) describen la pérdida de ZG16 en el cáncer colorrectal.

30 El set Affymetrix Gene Chip Human Genome U133 (http://www.helmholtz-hzi.de/fileadmin/user_upload/research/Research/Programme/Technological-platforms/Gene_Analysis/Service/humangenomeu133) describe secuencias oligonucleotídicas para un chip de genes Affymetrix.

Resumen de la invención

35 En la presente se describen métodos, composiciones y dispositivos que pueden proporcionar la detección del cáncer en un estadio temprano y disminuir la frecuencia de resultados del ensayo falsos positivos y falsos negativos.

40 Los análisis moleculares pueden emplearse para identificar genes que son altamente expresados en tejidos de tumor gástrico, pero que no estén necesariamente sobreexpresados, comparado con tejido gástrico no maligno. Estos análisis incluyen métodos de micromatrices de DNA ("*microarrays*") y de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR). Los genes del cáncer, los ARN y las proteínas codificadas por estos genes se denominan en la presente marcadores de tumores malignos gástricos (GTM). Debe entenderse que el término GTM no necesita que el marcador sea específico solo para los tumores gástricos. Por el contrario, la expresión de GTM puede estar aumentada en otros tipos de tumores, que incluyen tumores malignos o no malignos, que incluyen cánceres gástricos, de vejiga, colorrectales, pancreáticos, de ovario, de piel (por ejemplo, melanomas), de hígado, esofágicos, endometriales y de cerebro, entre otros. Sin embargo, debe entenderse que el término GTM no incluye los marcadores de la técnica anterior, tales como CA19-9, CA72-4, pepsinógeno y CEA, o cualquier otro marcador que haya sido previamente identificado como indicativo de tumores gástricos. Algunos GTM se segregan o escapan de los tumores a unos niveles suficientes como para ser un diagnóstico del cáncer gástrico con un alto grado de fiabilidad y, en otros casos, las mediciones de dos o más GTM pueden proporcionar un diagnóstico fiable del cáncer gástrico.

50 Las proteínas que son segregadas o escindidas de las células, solas o en combinación entre sí, tienen utilidad como marcadores séricos o de fluidos corporales para el diagnóstico del cáncer gástrico, o como marcadores para controlar el avance de una enfermedad establecida. La detección de marcadores de proteínas puede realizarse empleando métodos conocidos en la técnica e incluye el uso de anticuerpos monoclonales, antisuero policlonal y similares.

55 En la presente se describe un método para detectar el cáncer gástrico, que comprende:

(i) proporcionar una muestra biológica; y

(ii) detectar los niveles de proteína del gránulo de zimógeno humana 16 ("ZG16") en dicha muestra.

La presente invención proporciona un método para detectar el cáncer gástrico, que comprende: (i) proporcionar una muestra de sangre, plasma o suero; (ii) detectar los niveles de proteína del gránulo de zimógeno humana 16 ("ZG16") en dicha muestra; y (iii) comparar la cantidad de ZG16 en dicha muestra con un valor obtenido a partir de una o más muestras control que no presentan cáncer gástrico, en el que la sobreexpresión de ZG16 en la muestra biológica es indicativa de cáncer gástrico. La presente invención proporciona además el uso de un anticuerpo específico para la proteína del gránulo de zimógeno humana 16 ("ZG16") para detectar el cáncer gástrico en una muestra de sangre, plasma o suero.

En un aspecto, la sobreexpresión de ZG16 en un paciente es indicativa de que el paciente tiene cáncer gástrico.

Puede seleccionarse otro miembro de la familia de GTM a partir del grupo que consiste en mucina 5AC ("MUC5AC"), o mucina 17 ("MUC17"). El método puede implicar la detección de ZG16 y MUC5AC, ZG16 y MUC17, o ZG16 y MUC5AC y MUC17.

El otro miembro de la familia de GTM también puede comprender uno o más de otros miembros de la familia de GTM, por ejemplo, cualquiera de MUC5AC, MUC17, ZG16, cadena de 83 kDa del polipéptido 2 de la carboxipeptidasa N (CPN2), metaloproteínasa de matriz 12 (MMP12), inhibina ("INHBA"), factor del crecimiento de tipo insulínico 7 ("IGFBP7"), gamma-glutamil hidrolasa ("GGH"), proteoglicano enriquecido en leucina y prolina ("LEPRE1"), cistatina S ("CST4"), proteína relacionada con frizzled segregada 4 ("SFRP4"), asporina ("ASPN"), regulador del crecimiento celular con dominio de mano EF 1 ("CGREF1"), calicreína 10 (KLK10), inhibidor tisular de metaloproteínasa 1 ("TIMP1"), proteína rica en cisteína ácida segregada ("SPARC"), factor del crecimiento transformante, 13-inducido ("TGFB1"), proteína de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 2 ("EFEMP2"), lumicano ("LUM"), estanina ("SNN"), fosfoproteína segregada 1 ("SPP1"), proteoglicano de sulfato de condroitina 2 ("CSPG2"), N-acilesfingosina amidohidrolasa ("ASAH1"), serina proteasa 11 ("PRSS11"), proteína relacionada con frizzled segregada 2 ("SFRP2"), fosfolipasa A2, grupo XIIB ("PLA2G12B"), espondina 2, proteína de la matriz extracelular ("SPON2"), olfactomedina 1 ("OLFM1"), repetición de tromboespondina que contiene 1 ("TSRC1"), tromboespondina 2 ("THBS2"), adicano, cistatina SA ("CST2"), cistatina SN ("CST1"), enzima de tipo lisil oxidasa 2 ("LOXL2"), tiroglobulina ("TG"), factor del crecimiento transformante beta1 ("TGFB1"), inhibidor de serina o cisteína proteinasa Clado H, miembro 1 ("SERPINH1"), inhibidor de serina o cisteína proteinasa Clado B, miembro 5 ("SERPINB5"), metaloproteínasa de matriz 2 ("MMP2"), proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 5 ("PCSK5"), proteína de enlace de glicoproteína de hialuronano 4 ("HAPLN4"), CA19-9, CA72-4, pepsinógeno, CEA, MUC5AC y MUC17.

Un ejemplo de una combinación de marcadores de GTM que puede utilizarse según la presente invención es MUC5AC, MUC17, ZG16, cistatina SN, serpina H1 y serpina B5.

En la presente se describe cualquier método adecuado para detectar el nivel de GTM, y puede incluir detectar los niveles de ARNm de GTM, ADNc de GTM, empleando un oligonucleótido complementario con al menos una porción de dicho ADNc de GTM, empleando un método de qRT-PCR que utiliza un cebador directo y un cebador inverso, detectar los niveles de una proteína de GTM, detectar los niveles de un péptido de GTM, por ejemplo, empleando un anticuerpo dirigido contra dicho GTM. Puede emplearse cualquier anticuerpo adecuado, y puede ser un anticuerpo monoclonal o un antisuero policlonal. El método puede realizarse empleando un método de inmunoensayo de tipo "sandwich" o empleando un chip de anticuerpos.

En la presente también se describe un dispositivo para detectar un GTM, que comprende: un sustrato que tiene un reactivo de captura de GTM sobre él; y un detector asociado con dicho sustrato, siendo capaz dicho detector de detectar un GTM asociado con dicho reactivo de captura.

El reactivo de captura de GTM puede ser un oligonucleótido o un anticuerpo específico para un oligonucleótido de GTM, una proteína de GTM o un péptido de GTM.

En la presente se describe además un kit para detectar el cáncer, que comprende:

un sustrato que tiene un reactivo de captura de GTM sobre él;

un medio para visualizar un complejo de dicho agente de captura de GTM y un GTM; reactivos; e

instrucciones de uso, en el que dicho GTM comprende la proteína del gránulo de zimógeno humana 16 ("ZG16").

El reactivo de captura de GTM es un oligonucleótido específico de GTM o un anticuerpo específico de GTM selectivo para un oligonucleótido de GTM, una proteína de GTM o un péptido de GTM.

En la presente también se describe un método para detectar un cáncer gástrico, que comprende las etapas de:

proporcionar una muestra de ensayo para un paciente en riesgo de padecer cáncer gástrico; medir la presencia de una proteína de GTM en dicha muestra de ensayo; y

5 comparar la cantidad de GTM presente en dicha muestra de ensayo con un valor obtenido a partir de una muestra control procedente de un sujeto que no padece cáncer gástrico, en el que dicho GTM comprende la proteína del gránulo de zimógeno humana 16 ("ZG16").

En la presente también se describe un método para seleccionar un cáncer gástrico, que comprende las etapas de:

proporcionar una muestra de ensayo procedente de un sujeto de ensayo;

medir la presencia de un GTM en dicha muestra de ensayo; y

10 comparar la cantidad de GTM presente en dicha muestra de ensayo con un valor obtenido a partir de una muestra control procedente de un sujeto que no padece cáncer gástrico, en el que dicho GTM comprende la proteína del gránulo de zimógeno humana 16 ("ZG16").

El GTM puede ser una proteína o un péptido de GTM, o un oligonucleótido específico para un GTM. El oligonucleótido puede ser ADN o ARN.

Según el método, la etapa de medición puede emplear un ensayo ELISA.

15 La muestra de ensayo puede obtenerse de plasma, tejido, orina, fluido gástrico, suero y deposiciones.

Breve descripción de las figuras

Esta invención se describe con referencia a realizaciones específicas de la misma y con referencia a las figuras, en las que:

20 La figura 1 muestra una tabla resultado del análisis de la micromatriz de ADN que muestra genes con una alta expresión relativa en tejido tumoral. Se clasificó la intensidad de la señal para cada gen en tejido tumoral y en tejido no maligno. La tabla muestra los GTM con una clasificación más alta que el marcador del cáncer gástrico existente CEA (codificado por el gen CEACAM5).

La figura 2 expone una tabla que muestra las características de muestras de suero empleadas en el análisis con la matriz de anticuerpos.

25 La figura 3 expone histogramas que muestran la distribución de muestras de tumor y no malignas según su nivel de expresión de (a) ZG16 y (b) MUC17. El nivel de expresión de los dos genes se obtuvo mediante RT-qPCR.

La figura 4 expone diagramas de cajas que muestran la detección de (a) MUC17 y (b) ZG16 en el suero de pacientes con cáncer gástrico y controles empleando matrices de anticuerpos y detección de RCA.

Descripción detallada

30 Definiciones

Antes de describir las realizaciones de la invención en detalle, será útil proporcionar algunas definiciones de términos, tal como se emplean en la presente.

35 El término "GTM" o las expresiones "marcador de tumor gástrico" o "miembro de la familia de GTM" significan un gen, un fragmento de gen, ARN, un fragmento de ARN, una proteína o un fragmento de proteína relacionada u otra molécula identificativa asociada con el cáncer gástrico. Los GTM descritos en la presente no incluyen moléculas que son conocidas en la técnica anterior por estar asociadas con el cáncer gástrico, por ejemplo, CA19-9, CA72-4, pepsinógeno y CEA. Sin embargo, los marcadores descritos en la presente pueden utilizarse en combinaciones nuevas y de la invención con GTM previamente descritos.

40 El término "marcador" se refiere a una molécula que está asociada cuantitativa o cualitativamente con la presencia de un fenómeno biológico. Los ejemplos de "marcadores" incluyen un polinucleótido, tal como un gen o fragmento de gen, ARN o fragmento de ARN; o un producto génico, que incluye un polipéptido tal como un péptido, oligopéptido, proteína o fragmento de proteína; o cualquier metabolito relacionado, subproducto, o cualquier otra molécula identificativa, tal como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que estén relacionados directa o indirectamente con un mecanismo que subyace al fenómeno. Los marcadores descritos en la presente incluyen las secuencias de nucleótidos (por ejemplo, secuencias de GenBank) tal como se describen en la presente, en particular, las secuencias de longitud completa, cualquier secuencia codificadora, cualquier fragmento, o cualquier complemento de los mismos, y cualquier marcador mensurable de los mismos, tal como se definió anteriormente.

50 Tal como se usa en la presente, "anticuerpos" y términos similares se refieren a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Estas incluyen, aunque

5 no se limitan a moléculas policlonales, monoclonales, quiméricas, monocatenarias, fragmentos Fc, Fab, Fab' y Fab₂, y un banco de expresión de Fab. Las moléculas de anticuerpos están incluidas en cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren unas de otras por la naturaleza de cadena pesada presente en la molécula. Estas incluyen además las subclases, tales como IgG1, IgG2 y otras. La cadena ligera puede ser una cadena kappa o una
 10 cadena lambda. La referencia en la presente a anticuerpos incluye la referencia a todas las clases, subclases y tipos. También se incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos que son específicos de más de una fuente, por ejemplo, una secuencia de ratón o humana. Se incluyen además anticuerpos de camélido, anticuerpos de tiburón o nanocuerpos.

10 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el proceso fisiológico en mamíferos que se caracteriza generalmente por un crecimiento celular anómalo o no regulado. El cáncer y la patología de cáncer pueden asociarse, por ejemplo, con metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células próximas, liberación de citoquinas u otros productos secretores a niveles anómalos, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de tejidos u órganos circundantes o
 15 distantes, tales como nódulos linfáticos, etc. Específicamente se incluyen los melanomas.

15 El término "tumor" se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

La expresión "cáncer gástrico" se refiere a un tumor que se origina en el estómago. Estos tumores son capaces de metastatizar hasta cualquier órgano.

20 Las expresiones "expresado diferencialmente", "expresión diferencial" y expresiones similares, se refieren a un marcador génico cuya expresión está activada a un nivel mayor o menor en un sujeto (por ejemplo, una muestra de ensayo) que tiene un trastorno, específicamente cáncer, tal como melanoma, respecto a su expresión en un sujeto de control (por ejemplo, una muestra de referencia). Las expresiones también incluyen marcadores cuya expresión se activa a un nivel mayor o menor en diferentes estadios del mismo trastorno; en enfermedades con buena o mala
 25 prognosis; o en células con niveles mayores o menores de proliferación. Un marcador expresado de forma diferencial puede estar activado o inhibido al nivel de polinucleótido o al nivel de polipéptido, o puede someterse a un corte y empalme alternativo para dar por resultado un producto de polipéptido diferente. Dichas diferencias pueden evidenciarse por un cambio en niveles de ARNm, expresión en la superficie, secreción u otra partición de un polipéptido, por ejemplo.

30 La expresión diferencial puede incluir una comparación de expresión entre dos o más marcadores (por ejemplo, genes o sus productos génicos); o una comparación de las proporciones de la expresión entre dos o más marcadores (por ejemplo, genes o sus productos génicos); o una comparación de dos productos procesados de forma diferente (por ejemplo, transcripciones o polipéptidos) del mismo marcador, que difieren entre sujetos normales y sujetos enfermos; o entre varias etapas de la misma enfermedad; o entre enfermedades con buena o
 35 mala prognosis; o entre células con niveles mayores y menores de proliferación; o entre tejido normal y tejido enfermo, específicamente cáncer, o melanoma. La expresión diferencial incluye la cuantitativa y la cualitativa, diferencias en el modelo de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión, por ejemplo, entre células normales o enfermas, o entre células que han sufrido diferentes acontecimientos de enfermedad o estadios de enfermedad, o células con diferentes niveles de proliferación.

40 El término "expresión" incluye la producción de polinucleótidos y polipéptidos, en particular, la producción de ARN (por ejemplo, ARNm) desde un gen o una porción de un gen, e incluye la producción de un polipéptido codificado por un ARN o un gen o porción de un gen, y la aparición de un material detectable asociado con la expresión. Por ejemplo, la formación de un complejo, por ejemplo, de una interacción polipéptido-polipéptido, interacción polipéptido-nucleótido, o similares, se incluye en el alcance del término "expresión". Otro ejemplo es la unión de un
 45 ligando de unión, tal como una sonda de hibridación o un anticuerpo, a un gen u otro polinucleótido u oligonucleótido, un polipéptido o un fragmento de proteína, y la visualización del ligando de unión. Así, la intensidad de una mancha en una micromatriz, en una transferencia de hibridación tal como una transferencia Northern, o en una inmunotransferencia, tal como una transferencia Western, o en una matriz de esferas, o por análisis PCR, se incluye en el término "expresión" de la molécula biológica subyacente.

50 Las expresiones "umbral de expresión" y "umbral de expresión definido" se usan de forma intercambiable y se refieren al nivel de un marcador en cuestión fuera del cual el polinucleótido o polipéptido sirve como un marcador predictivo para la supervivencia del paciente. El umbral depende del modelo predictivo establecido y se deriva experimentalmente de estudios clínicos tales como los descritos en los ejemplos posteriores. Dependiendo del modelo de predicción usado, el umbral de expresión puede fijarse para lograr la máxima sensibilidad, o para una máxima especificidad o para un error mínimo (máxima tasa de clasificación). Por ejemplo, un umbral mayor puede
 55 fijarse para alcanzar errores mínimos, aunque puede dar por resultado una menor sensibilidad. Por lo tanto, para cualquier modelo predictivo dado, se emplearán estudios clínicos para fijar un umbral de expresión que generalmente alcanza la mayor sensibilidad mientras que tiene una mínima tasa de error. La determinación del umbral de expresión para cualquier situación está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

El término "sensibilidad" significa la proporción de individuos con la enfermedad positivos en el ensayo (con el modelo). Así, una mayor sensibilidad significa menos resultados del ensayo falsos negativos.

El término "especificidad" significa la proporción de individuos sin la enfermedad negativos en el ensayo (con el modelo). Así, una mayor especificidad significa menos resultados del ensayo falsos positivos.

5 El término "micromatriz" se refiere a una disposición ordenada o desordenada de agentes de captura, preferiblemente polinucleótidos (por ejemplo, sondas) o polipéptidos en un sustrato. Véase, por ejemplo, *Microarray Analysis*, M. Schena, John Wiley & Sons, 2002; *Microarray Biochip Technology*, M. Schena, ed., Eaton Publishing, 2000; *Guide to Analysis of DNA Microarray Data*, S. Knudsen, John Wiley & Sons, 2004; y *Protein Microarray Technology*, D. Kambhampati, ed., John Wiley & Sons, 2004.

10 El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido, generalmente una sonda o cebador, que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, híbridos de ARN: ADN, y ADN bicatenarios. Los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos de sonda de ADN monocatenarios, se sintetizan a menudo por métodos químicos, por ejemplo, usando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados que están disponibles en el mercado, o por una diversidad de otros métodos, que incluyen sistemas de expresión *in vitro*, técnicas recombinantes, y expresión en células y organismos.

15 El término "sobrexpresión" o "sobrexpresado" se refiere a un nivel de expresión de un gen o marcador en un paciente que está por encima del que se observa en tejido normal. La expresión puede considerarse sobrexpresada si es 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, o mayor que 2 veces la expresión en tejido normal.

20 El término "polinucleótido", cuando se usa en el singular o plural, se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Esto incluye, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que incluye regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que incluye regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden monocatenarios o, más generalmente, bicatenarios, o incluyen regiones monocatenarias y bicatenarias. También se incluyen regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Se incluyen específicamente ARNm, ADNc y ADN genómicos, y cualquier fragmento de los mismos. El término incluye ADN y ARN que contienen una o más bases modificadas, tal como bases tritriadas, o bases inusuales, tales como inosina. Los polinucleótidos de la invención pueden incluir secuencias codificadoras o no codificadoras, o secuencias sentido o antisentido. Se entenderá que cada referencia a un "polinucleótido" o término similar, en la presente, incluirá las secuencias de longitud completa además de cualquier fragmento, derivado o variante de las mismas.

30 "Polipéptido", como se usa en la presente, se refiere a un oligopéptido, un péptido, o una secuencia de proteína, o fragmento de los mismos, y a moléculas que se dan de forma natural, recombinantes, sintéticas o semisintéticas. Cuando "polipéptido" se menciona en la presente para referirse a una secuencia de aminoácidos de una molécula de proteína que se da de forma natural, "polipéptido" y términos similares no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos nativa, completa, para la molécula de longitud total. Se entenderá que cada referencia a un "polipéptido" o término similar, en la presente, incluirá las secuencias de longitud completa además de cualquier fragmento, derivado o variante de los mismos.

35 El término "qPCR" o "QPCR" se refiere a la reacción de cadena de polimerasa cuantitativa como se describe, por ejemplo, en *PCR Technique: Quantitative PCR*, J.W. Larrick, ed., Eaton Publishing, 1997, y *A-Z of Quantitative PCR*, S. Bustin, ed., IUL Press, 2004.

40 El término RCA es una abreviatura de la amplificación de círculo rodante. La RCA es una técnica que implica el copiado repetido de un molde circular para amplificar una señal de una manera lineal.

45 La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación puede ser fácilmente determinada por los expertos en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, las sondas más largas necesitan temperaturas mayores para un reasociado apropiado, mientras que las sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para reasociarse cuando están presentes hebras complementarias en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que pueda usarse. Como resultado, se sigue que las temperaturas relativas mayores tenderán a hacer que las condiciones de reacción sean más rigurosas, mientras que unas temperaturas menores no tanto. Otros detalles y explicaciones de la rigurosidad de las reacciones de hibridación se encuentran por ejemplo, en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

50 "Condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen en la presente, generalmente: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/ dodecilsulfato sódico al 0,1% a 50 °C; (2) emplean un agente desnaturalizante durante la hibridación, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a

42 °C; o (3) emplean 50% de formamida, 5X SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato sódico, 5X, disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 ug/ml), 0,1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2X SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y 50% de formamida a 55 °C, seguido por un lavado de alta rigurosidad que comprende 0,1X SSC que contiene EDTA a 55 °C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y porcentaje de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas son una incubación durante la noche a 37 °C en una disolución que comprende: 20% de formamida, 5X SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), disolución 5X de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros en 1X SSC a aproximadamente 37-50 °C. Los expertos en la técnica sabrán cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. como sea necesario para incluir factores tales como la longitud de sonda y similares.

El término "MUC5AC" significa mucina 5AC (SEQ ID NO 1 y 4), e incluye el marcador MUC5AC, que incluye un polinucleótido, tal como un gen o un fragmento de gen, ARN o un fragmento de ARN; o un producto génico, que incluye un polipéptido tal como un péptido, un oligopéptido, una proteína o un fragmento de proteína; o cualquier metabolito relacionado, subproducto o cualquier otra molécula identificativa, tal como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

El término "MUC17" significa mucina humana 17, asociada a la superficie celular (SEQ ID NO 2 y 5), e incluye el marcador MUC17, que incluye un polinucleótido, tal como un gen o un fragmento de gen, ARN o un fragmento de ARN; o un producto génico, que incluye un polipéptido tal como un péptido, un oligopéptido, una proteína o un fragmento de proteína; o cualquier metabolito relacionado, subproducto o cualquier otra molécula identificativa, tal como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

El término "ZG16" significa la proteína del gránulo de zimógeno humana 16 (SEQ ID NO 3 y 6), e incluye el marcador ZG16, que incluye un polinucleótido, tal como un gen o un fragmento de gen, ARN o un fragmento de ARN; o un producto génico, que incluye un polipéptido tal como un péptido, un oligopéptido, una proteína o un fragmento de proteína; o cualquier metabolito relacionado, subproducto, o cualquier otra molécula identificativa, tal como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular y bioquímica, que están dentro de la técnica. Dichas técnicas se explican a fondo en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Sambrook *et al.*, 1989; Oligonucleotide Synthesis, M.J. Gait, ed., 1984; Animal Cell Culture, R.I. Freshney, ed., 1987; Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.; Handbook of Experimental Immunology, 4ª edición, D .M. Weir & CC. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987; Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987; y PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis *et al.*, eds., 1994.

Debe entenderse que los anteriores términos y expresiones se refieren a proteínas, secuencias de ADN y/o secuencias de ARN. También debe entenderse que los anteriores términos y expresiones se refieren también a proteínas, ADN y/o ARN no humanos que tengan secuencias homólogas, tal como se muestran en la presente.

Descripción de realizaciones de la invención

Generalmente, los marcadores tumorales se expresan de modo diferencial en el tejido tumoral y el correspondiente tejido no maligno. Esto proporciona un medio para distinguir entre pacientes con y sin cáncer. Sin embargo, es probable que la estructura anatómica y características fisiológicas de los tejidos tumorales conduzcan a diferencias en la acumulación de marcadores en el suero y otros fluidos biológicos, incluso si esos marcadores no están sobreexpresados en tejido tumoral. En particular, se prevé que la polaridad anómala de las células tumorales, la vasculatura permeable y la alta presión intersticial del tejido tumoral favorezca la salida de marcadores específicos fuera del tejido tumoral, comparado con tejido no maligno. Por consiguiente, se establece la hipótesis de que las proteínas segregadas que se expresan a niveles muy altos en tejido de tumor gástrico, pero que no están necesariamente sobreexpresadas comparadas con tejido gástrico no maligno, constituirán marcadores del cáncer gástrico útiles.

Empleando una combinación de análisis de micromatrices y reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR), se han identificado nuevos marcadores para la detección del cáncer gástrico. Estos nuevos marcadores de tumores gástricos (GTM) proporcionan más herramientas para la detección temprana del cáncer gástrico. De modo específico, la invención comprende los nuevos GTM: MUC5AC (SEQ ID NO 1 y 4), MUC17 (SEQ ID NO 2 y 5), y ZG16 (SEQ ID NO 3 y 6).

Los nuevos GTM puede emplearse aislados o, como alternativa, pueden combinarse como una firma (que comprende dos o más GTM). Una firma descrita en la presente incluye al menos uno de MUC5AC, MUC 17, y ZG16,

y al menos otro GTM, que puede ser un GTM según la presente invención o cualquier otro GTM, incluyendo los GTM conocidos.

Los GTM conocidos adecuados para su uso en combinación con los GTM descritos en la presente incluyen la cadena de 83 kDa del polipéptido 2 de la carboxipeptidasa N (CPN2), metaloproteinasa de matriz 12 (MMP12), inhibina ("INHBA"), factor del crecimiento de tipo insulínico 7 ("IGFBP7"), gamma-glutamyl hidrolasa ("GGH"), proteoglicano enriquecido en leucina y prolina ("LEPREI"), cistatina S ("CST4"), proteína relacionada con frizzled segregada 4 ("SFRP4"), asporina ("ASPN"), regulador del crecimiento celular con dominio de mano EF 1 ("CGREF1"), calicreína 10 (KLK10), inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 ("TIMP1"), proteína rica en cisteína ácida segregada ("SPARC"), factor del crecimiento transformante, 13-inducido ("TGFB1"), proteína de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 2 ("EFEMP2"), lumicano ("LUM"), estanina ("SNN"), fosfoproteína segregada 1 ("SPP1"), proteoglicano de sulfato de condroitina 2 ("CSPG2"), N-acilesfingosina amidohidrolasa ("ASAH1"), serina proteasa 11 ("PRSS11"), proteína relacionada con frizzled segregada 2 ("SFRP2"), fosfolipasa A2, grupo XIIB ("PLA2G12B"), espondina 2, proteína de la matriz extracelular ("SPON2"), olfactomedina 1 ("OLFM1"), repetición de tromboespondina que contiene 1 ("TSRC1"), tromboespondina 2 ("THBS2"), adicano, cistatina SA ("CST2"), cistatina SN ("CST1"), enzima de tipo lisil oxidasa 2 ("LOXL2"), tiroglobulina ("TG"), factor del crecimiento transformante beta1 ("TGFB1"), inhibidor de serina o cisteína proteinasa Clado H, miembro 1 ("SERPINH1"), inhibidor de serina o cisteína proteinasa Clado B, miembro 5 ("SERPINB5"), metaloproteinasa de matriz 2 ("MMP2"), proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 5 ("PCSK5"), proteína de enlace de glicoproteína de hialuronano 4 ("HAPLN4"), CA19-9, CA72-4, pepsinógeno y CEA, o cualquier otro marcador que haya sido previamente identificado como indicativo de tumores gástricos.

El término "fiabilidad" incluye la baja incidencia de falsos positivos y/o falsos negativos. Así, con un marcador de alta fiabilidad se asocian menos falsos positivos y/o falsos negativos con los diagnósticos realizados empleando ese marcador. Por tanto, en ciertas realizaciones, se proporcionan marcadores que permiten la detección del cáncer gástrico con una fiabilidad mayor que la fiabilidad de los marcadores de la técnica anterior de aproximadamente 50%. En otras realizaciones, se proporcionan marcadores con una fiabilidad mayor que aproximadamente 70%, en otras realizaciones, mayor que aproximadamente 73%, en otras realizaciones, mayor que aproximadamente 80%, en otras realizaciones, mayor que aproximadamente 90%, en otras realizaciones, mayor que aproximadamente 95%, en otras realizaciones, mayor que aproximadamente 98%, y en ciertas realizaciones aproximadamente 100% de fiabilidad.

30 Estrategias generales para la detección del cáncer

A continuación se resumen las metodologías generales para determinar los niveles de expresión, aunque se apreciará que cualquier método para determinar los niveles de expresión será adecuado.

PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR) puede realizarse en muestras de tumor, en suero y plasma utilizando sondas y cebadores específicos de GTM. En reacciones controladas, la cantidad de producto formado en una reacción de PCR (Sambrook, J., E. Fritsch, E. y T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (2001)) se correlaciona con la cantidad de molde de partida. La cuantificación del producto de la PCR puede realizarse deteniendo la reacción de PCR cuando se encuentre en la fase logarítmica, antes de que los reactivos se conviertan en limitantes. Los productos de la PCR después se someten a una electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, se tiñen con bromuro de etidio o un tinte de ADN comparable, y se mide la intensidad de la tinción mediante una densitometría. Como alternativa, el avance de una reacción de PCR puede medirse empleando máquinas de PCR, tales como Applied Biosystems' Prism 7000 o Roche LightCycler, que miden la acumulación del producto a tiempo real. La PCR de tiempo real mide la fluorescencia de tintes intercalantes en el ADN, tales como Sybr Green en el producto de la PCR sintetizado, o la fluorescencia liberada por una molécula indicadora cuando se escinde de una molécula extintora; las moléculas indicadora y extintora se incorporan en una sonda oligonucleotídica que se hibrida con la molécula de ADN diana después de la extensión de la hebra de ADN desde los oligonucleótidos cebadores. La sonda oligonucleotídica se desplaza y es degradada mediante la acción enzimática de la Taq polimerasa en el siguiente ciclo de PCR, liberando el indicador de la molécula extintora. En una variación, conocida como Scorpion®, la sonda se une covalentemente al cebador.

PCR de transcripción inversa (RT-PCR)

La RT-PCR puede utilizarse para comparar niveles de ARN en diferentes poblaciones de muestras, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármaco, para caracterizar patrones de expresión, para discriminar entre ARN muy relacionados, y para analizar la estructura del ARN.

Para la RT-PCR, la primera etapa es el aislamiento del ARN de una muestra diana. El material de partida es generalmente ARN total aislado de tumores humanos o líneas celulares tumorales, y se corresponde con tejidos normales o líneas celulares, respectivamente. El ARN puede aislarse a partir de una diversidad de muestras, tales como muestras tumorales de tejidos de mama, pulmón, colon (por ejemplo intestino delgado o intestino grueso),

colorrectal, gástrico, esofágico, anal, rectal, de próstata, de cerebro, riñón, páncreas, bazo, timo, testículo, ovario, útero, vejiga, etc., de tumores primarios o líneas de células tumorales, y de muestras reunidas de donantes sanos. Si la fuente de ARN es un tumor, el ARN puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejido congelado o incorporado en parafina archivadas y fijadas (por ejemplo, fijado con formalina).

5 La primera etapa en la formación de perfiles de expresión génica por RT-PCR es la transcripción inversa del molde de ARN en ADNc, seguido por su amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos transcriptasas inversas usadas de forma más común son la transcriptasa inversa del virus de mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La etapa de transcripción inversa se
10 ceba generalmente usando cebadores específicos, hexámeros aleatorios, o cebadores de oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y el objetivo de la formación de perfiles de expresión. Por ejemplo, el ARN extraído puede transcribirse de forma inversa usando un equipo PCR de ARN GeneAmp (Perkin Elmer, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc derivado puede usarse entonces como un molde en la posterior reacción de PCR.

15 Aunque la etapa de PCR puede usar una variedad de ADN polimerasas dependientes de ADN termoestables, generalmente emplea la Taq ADN polimerasa, que tiene una actividad de 5'-3' nucleasa pero carece de una actividad endonucleasa correctora 3'-5'. Así, TaqMan qPCR generalmente utiliza la actividad 5' nucleasa de Taq o Tth polimerasa para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, aunque puede usarse cualquier enzima con actividad 5' nucleasa equivalente.

20 Dos cebadores oligonucleotídicos se usan para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar la secuencia de nucleótidos situada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extensible por la enzima Taq ADN polimerasa, y se marca con un tinte fluorescente indicador y un tinte fluorescente extintor. Cualquier emisión inducida por láser desde el tinte indicador se apaga por el tinte extintor cuando los dos tintes se sitúan bastante juntos como están en la sonda. Durante la reacción de
25 amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa escinde la sonda de una manera dependiente del molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en disolución, y la señal desde el tinte indicador liberado está libre del efecto extintor del segundo fluoróforo. Una molécula de tinte indicador se libera por cada nueva molécula sintetizada, y la detección del tinte indicador no extinguido proporciona la base de la interpretación cuantitativa de los datos.

30 TaqMan RT-PCR puede realizarse usando equipo disponible en el mercado, tal como, por ejemplo, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento de 5' nucleasa se ejecuta en un dispositivo de PCR cuantitativa a tiempo real tal como ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. El sistema consiste en un termociclador, láser, dispositivo acoplado por carga (CCD), cámara y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica por todos los 96 pocillos y
35 se detecta en el CCD. El sistema incluye software para hacer funcionar el instrumento y para analizar los datos.

Los datos del ensayo de 5' nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Tal como se analizó anteriormente, los valores de fluorescencia se recogen durante todo el ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese punto en la reacción de amplificación. El punto en el que la señal fluorescente se registra por primera vez como estadísticamente significativa es el ciclo umbral.

40 **PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)**

Una variación más reciente de la técnica RT-PCR es la PCR cuantitativa a tiempo real, que mide la acumulación de producto de PCR a través de una sonda fluorogénica con marcaje dual (es decir, sonda TaqMan). La PCR a tiempo real es compatible con la PCR competitiva cuantitativa y con la PCR comparativa cuantitativa. La primera emplea un competidor interno para cada secuencia diana para la normalización, mientras que la segunda emplea un gen de
45 normalización contenido dentro de la muestra, o un gen constitutivo para RT-PCR. Se proporcionan más detalles, por ejemplo, en Held *et al.*, Genome Research 6: 986-994 (1996).

Los niveles de expresión pueden determinarse usando tejidos incorporados en parafina, fijados, como la fuente de ARN. Según un aspecto de la presente invención, los cebadores y sondas de PCR se diseñan para que flanqueen secuencias de intrón presentes en el gen a amplificar. En esta realización, la primera etapa en el diseño del
50 cebador/sonda es la delineación de secuencias de intrón en los genes. Esto puede hacerse mediante software disponible públicamente, tal como el software DNA BLAT desarrollado por Kent, W. J., Genome Res. 12 (4): 656-64 (2002), o por el software BLAST que incluye sus variaciones. Las etapas posteriores siguen métodos bien establecidos de diseño de cebadores y sondas de PCR.

Para evitar señales no específicas, es útil enmascarar secuencias repetitivas en los intrones cuando se diseñan los
55 cebadores y sondas. Esto puede conseguirse fácilmente usando el programa Repeat Masker disponible en línea a través del Baylor College of Medicine, que selecciona secuencias de ADN frente a un banco de elementos repetitivos y devuelve una secuencia de consulta en la que los elementos repetitivos están enmascarados. Las secuencias enmascaradas pueden usarse entonces para diseñar las secuencias de cebador y sonda usando

cualquier paquete de diseño de cebador/sonda disponible comercial o públicamente de otra forma, tal como Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Steve Rozen y Helen J. Skaletsky (2000), Primer3 on the VIMNV for general users and for biologist programmers en: Krawetz S., Misener S. (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, págs. 365-386).

Los factores más importantes considerados en el diseño de cebador de PCR incluyen la longitud del cebador, la temperatura de fusión (T_m), y el contenido G/C, especificidad, secuencias de cebador complementarias y secuencia final 3'. En general, los cebadores de PCR óptimos tienen generalmente 1730 bases de longitud, y contienen aproximadamente 20-80%, tal como por ejemplo, 50-60% de bases G+C. Las temperaturas de fusión entre 50 y 80°C, por ejemplo, aproximadamente 50 a 70°C, se prefieren generalmente. Para otras directrices para el diseño de cebadores y sondas de PCR véase, por ejemplo, Dieffenbach, C. W. *et al.*, General Concepts for PCR Primer Design en: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1995, pp.133-155; Innis y Gelfand, Optimization of PCRs en: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CCR Press, Londres, 1994, págs. 5-11; y Plasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. *Methods Mol. Biol.* 70: 520-527 (1997).

15 **Análisis de micromatrices de ADN**

También puede identificarse la expresión diferencial, o confirmarse usando la técnica de micromatrices. Así, el perfil de expresión de GTM puede medirse en tejido tumoral tanto fresco como incorporado en parafina, usando la tecnología de micromatrices. En este método, las secuencias de polinucleótidos de interés (que incluyen ADNc y oligonucleótidos) se cultivan en placa, o se construyen matrices, sobre un sustrato de microchip. Las secuencias en matrices (es decir, sondas de captura) se hibridan entonces con polinucleótidos específicos de células o tejidos de interés (es decir, dianas). Como en el método RT-PCR, la fuente de ARN es generalmente ARN total aislado de tumores humanos o líneas celulares tumorales, y tejidos o líneas celulares normales correspondientes. Así el ARN puede aislarse de una variedad de tumores o líneas celulares tumorales primarios. Si la fuente de ARN es un tumor primario, el ARN puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejido incorporadas en parafina fijadas en formalina (FFPE) archivadas o congeladas y muestras de tejido fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina), que se preparan de forma rutinaria y se conservan en la práctica clínica diaria.

En una realización específica de la técnica de micromatrices, se aplican inserciones amplificadas por PCR de clones de ADNc a un sustrato. El sustrato puede incluir secuencias de hasta 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 75 nucleótidos. En otros aspectos, el sustrato puede incluir secuencias de al menos 10.000 nucleótidos. Las secuencias en forma de micromatrices, inmovilizadas en el microchip, son adecuadas para la hibridación en condiciones rigurosas. Como otras realizaciones, las dianas para las micromatrices pueden tener al menos 50, 100, 200, 400, 500, 1000 o 2000 bases de longitud; o 50-100, 100-200, 100-500, 100-1000, 100-2000 o 500-5000 bases de longitud. Como realizaciones adicionales, las sondas de captura para las micromatrices pueden tener al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 80 o 100 bases de longitud; o 10-15, 10-20, 10-25, 10-50, 10-75, 10-80, o 20-80 bases de longitud.

Las sondas de ADNc marcadas de forma fluorescente pueden generarse mediante la incorporación de nucleótidos fluorescentes por transcripción inversa de ARN extraído de tejidos de interés. Las sondas de ADNc marcadas aplicadas al chip se hibridan con especificidad a cada mancha de ADN en la matriz. Después del lavado riguroso para eliminar las sondas unidas de forma no específica, el circuito se barre por microcopia de láser confocal o por otro método de detección, tal como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento en la matriz permite la evaluación de la abundancia de ARNm correspondiente. Con la fluorescencia de color dual, las sondas de ADNc marcadas de forma separada generadas a partir de dos fuentes de ARN se hibridan en pares a la matriz. La abundancia relativa de las transcripciones de las dos fuentes que se corresponden a cada gen especificado se determina así de forma simultánea.

La escala miniaturizada de la hibridación permite una evaluación conveniente y rápida del diseño de expresión para grandes números de genes. Dichos métodos han demostrado tener la sensibilidad necesaria para detectar transcripciones raras, que se expresan en unas pocas copias por célula, y para detectar de forma reproducible diferencias de al menos aproximadamente dos iteraciones en los niveles de expresión (Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (2): 106-149 (1996)). El análisis de micromatrices puede realizarse mediante un equipo disponible en el mercado, siguiendo los protocolos del fabricante, tal como usando la tecnología GenChip Affymetrix, tecnología de micromatriz Illumina o tecnología de micromatriz de Incyte. El desarrollo de métodos de micromatrices para el análisis a gran escala de la expresión génica hace posible buscar sistemáticamente marcadores moleculares de clasificación para el cáncer y la predicción de resultados en una variedad de tipos de tumor.

Aislamiento, purificación y amplificación de ARN

Los métodos generales para la extracción de ARNm se conocen bien en la técnica y se describen en libros de texto convencionales de la biología molecular, que incluyen Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Los métodos para la extracción de ARN de tejidos incorporados en parafina se describen, por ejemplo, en Rupp y Locker, *Lab Invest.* 56: A67 (1987), y De Sandres *et al.*, *BioTechniques* 18: 42044 (1995). En particular, el aislamiento de ARN puede realizarse usando un kit de purificación, un conjunto de tampones, y

proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, según las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de células en cultivo puede aislarse usando mini-columnas Qiagen RNeasy. Otros equipos de aislamiento de ARN disponibles en el mercado incluyen MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE (D, Madison, WI), y Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.). El ARN total de las muestras de tejido puede aislarse usando ARN Stat-60 (Tel-Test). El ARN preparado a partir de un tumor puede aislarse, por ejemplo, por centrifugado en gradiente de densidad en cloruro de cesio.

Las etapas de un protocolo representativo para la formación del perfil la expresión génica usando tejidos incorporados en parafina, fijados, como fuente de ARN, que incluyen el aislamiento del ARNm, la purificación, la extensión con cebador y la amplificación se ofrecen en varios artículos periódicos publicados (por ejemplo: T. E. Godfrey *et al.* J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); K. Specht *et al.*, Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). Brevemente, un procedimiento representativo comienza con el corte de secciones de aproximadamente 10 micrómetros de espesor de muestras de tejido tumoral incorporado en parafina. El ARN se extrae entonces, y la proteína y el ADN se eliminan. Después del análisis de la concentración de ARN, pueden incluirse las etapas de reparación de ARN y/o amplificación, si fuera necesario, y el ARN se transcribe de forma inversa usando promotores específicos de gen, seguido de una RT-PCR. Por último, los datos se analizan para identificar la mejor o mejores opciones de tratamiento disponibles para el paciente en base al patrón de expresión génica característico identificado en la muestra tumoral examinada.

Inmunohistoquímica y proteómica

Los métodos de la inmunohistoquímica son también adecuados para detectar los niveles de expresión de los marcadores de proliferación descritos en la presente. Así, se emplean anticuerpos o antisueros, preferiblemente antisueros policlonales y lo más preferiblemente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador, para detectar la expresión. Los anticuerpos pueden detectarse marcando de forma directa los anticuerpos en sí mismos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de haptenos, tales como biotina, o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. De forma alternativa, se usa un anticuerpo primario no marcado junto con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos y equipos de inmunohistoquímica se conocen bien en la técnica y están disponibles en el mercado.

Puede emplearse la proteómica para analizar los polipéptidos presentes en una muestra (por ejemplo, de tejido, organismo o cultivo celular) en un cierto momento. En particular, las técnicas proteómicas pueden usarse para evaluar los cambios globales de expresión de polipéptidos en una muestra (también denominado proteómica de expresión). El análisis proteómico incluye generalmente: (1) separación de polipéptidos individuales en una muestra por electroforesis en gel 2-D (2-D PAGE); (2) identificación de los polipéptidos individuales recuperados del gel, por ejemplo, por espectrometría de masas o secuenciación N-terminal, y (3) análisis de los datos usando bioinformática. Los métodos proteómicos son complementos valiosos para otros métodos de formación de perfiles de expresión génica, y pueden usarse, solos o en combinación con otros métodos, para detectar los productos de los marcadores de proliferación descritos en la presente.

Métodos de hibridación empleando sondas de ácidos nucleicos selectivas para un marcador

Estos métodos implican unir la sonda de ácido nucleico a un soporte e hibridar bajo condiciones apropiadas con ARN o ADNc derivado de la muestra de ensayo (Sambrook, J., E. Fritsch, E. y T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (2001)). Estos métodos pueden aplicarse a GTM derivados de un tejido tumoral o muestra de fluido. Las preparaciones de ARN o ADNc generalmente se marcan con una molécula fluorescente o radiactiva para permitir la detección y la cuantificación. En algunas aplicaciones, el ADN hibridante puede marcarse con una estructura ramificada marcada con fluorescencia para potenciar la intensidad de la señal (Nolte, F.S., Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens, Adv. Clin. Chem., 33, 201-235 (1998)). El marcador no hibridado se retira mediante un lavado a fondo con disoluciones de baja salinidad, tales como 0,1x SSC, 0,5% de SDS antes de cuantificar la cantidad de hibridación mediante detección de fluorescencia o densitometría de imágenes de gel. Los soportes pueden ser sólidos, tales como nailon o membranas de nitrocelulosa, o consistir en microesferas o esferas que se hibridan cuando se encuentran en una suspensión líquida. Para permitir el lavado y la purificación, las esferas pueden ser magnéticas (Haukanes, B-1 y Kvam, C., Application of magnetic beads in bioassays, Bio/Technology, 11, 60-63 (1993)) o pueden estar marcadas por fluorescencia para permitir una citometría de flujo (véase, por ejemplo: Spiro, A., Lowe, M. y Brown, D., A Bead-Based Method for Multiplexed Identification and Quantitation of DNA Sequences Using Flow Cytometry, Appl. Env. Micro., 66, 4258-4265 (2000)).

Una variación de la tecnología de la hibridación es el ensayo QuantiGene Plexe (Genospectra, Fremont) que combina un soporte de esferas fluorescentes con una amplificación de la señal del ADN ramificado. Otra variación de la tecnología de la hibridación es el ensayo de ARNm Quantikine® (R&D Systems, Minneapolis). La metodología se describe en las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ensayo emplea sondas de hibridación oligonucleotídicas conjugadas con digoxigenina. La hibridación se detecta empleando anticuerpos anti-digoxigenina acoplados a fosfatasa alcalina en ensayos colorimétricos.

Otros métodos son muy conocidos en la técnica y no es necesario describirlos con más detalle en la presente.

Ensayos inmunológicos ligados a enzimas (ELISA)

Brevemente, en los ensayos de ELISA en "sandwich", un anticuerpo policlonal o monoclonal contra el GTM se une a un soporte sólido (Crowther, J.R., The ELISA guidebook. Humana Press: Nueva Jersey (2000); Harlow, E. y Lane, D., Using antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (1999)) o esferas en suspensión. Otros métodos son muy conocidos en la técnica y no es necesario describirlos con más detalle en la presente. Los anticuerpos monoclonales pueden derivarse de hibridomas o seleccionarse de bancos de anticuerpos de fagos (Hust M. y Dubel S., Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments, Methods Mol. Biol., 295:71-96 (2005)). Los sitios de unión no específica se bloquean con detergentes y preparaciones de proteínas que no son la diana. Después el anticuerpo de captura se incuba con una preparación de muestra o tejido del paciente que contiene el antígeno de GTM. La mezcla se lava antes de que el complejo de antígeno/anticuerpo se incuba con un segundo anticuerpo que detecta el GTM diana. El segundo anticuerpo generalmente está conjugado con una molécula fluorescente u otra molécula indicadora que puede detectarse en una reacción enzimática o con un tercer anticuerpo conjugado con un indicador (Crowther, Id.). Como alternativa, en ELISA directos, la preparación que contiene el GTM puede unirse al soporte o esfera, y el antígeno diana puede detectarse directamente con un conjugado de anticuerpo-indicador (Crowther, Id.).

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales y antiseros policlonales son muy conocidos en la técnica y no es necesario describirlos con más detalle en la presente.

Inmunodetección

Los métodos también pueden emplearse para la inmunodetección de miembros de la familia de marcadores en suero o plasma procedente de pacientes con cáncer gástrico antes y después de una cirugía para retirar el tumor, una inmunodetección de miembros de la familia de marcadores en pacientes con otros cánceres que incluyen, pero no se limitan a cáncer colorrectal, pancreático, ovárico, melanoma, de hígado, esofágico, de estómago, endometrial y de cerebro, y la inmunodetección de miembros de la familia de marcadores en orina y deposiciones de pacientes con cáncer gástrico.

Los GTM también pueden detectarse en tejidos o muestras empleando otras técnicas de inmunodetección convencionales, tales como inmunotransferencia o inmunoprecipitación (Harlow, E. y Lane, D., Using antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (1999)). En la inmunotransferencia, las preparaciones de proteínas de tejido o fluido que contiene el GTM se someten a una electroforesis a través de geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes o no desnaturalizantes. Las proteínas después se trasladan a un soporte de membrana, tal como nailon. El GTM después se hace reaccionar directa o indirectamente con anticuerpos monoclonales o policlonales según se describen para la inmunohistoquímica. Como alternativa, en algunas preparaciones, las proteínas pueden rociarse directamente sobre membranas sin una separación electroforética previa. La señal puede cuantificarse mediante densitometría.

En la inmunoprecipitación, una preparación soluble que contiene el GTM se incuba con un anticuerpo monoclonal o policlonal contra el GTM. La reacción después se incuba con esferas inertes fabricadas de agarosa o poliacrilamida con proteína A o proteína G unida covalentemente. Las esferas de proteína A o de proteína G interactúan específicamente con los anticuerpos que forman un complejo inmovilizado de anticuerpo-GTM-antígeno unido a la esfera. Después de lavar, el GTM unido puede detectarse y cuantificarse mediante inmunotransferencia o ELISA.

40 Determinación del umbral

Para los ensayos que emplean GTM, se obtendrán umbrales que permitirán denominar a una muestra positiva o negativa para el cáncer gástrico. Estos umbrales serán determinados mediante el análisis de cohortes de pacientes que estén siendo investigados para la presencia del cáncer gástrico. Los umbrales pueden variar para diferentes aplicaciones de ensayo; por ejemplo, los umbrales para la utilización del ensayo en la selección de una población se determinarán empleando cohortes de pacientes que estén en gran parte exentos de síntomas urológicos, y estos umbrales pueden ser diferentes de los utilizados en ensayos para pacientes que están siendo observados para la recurrencia del cáncer gástrico. Puede seleccionarse un umbral para proporcionar un nivel práctico de especificidad de ensayo en el emplazamiento clínico necesario, es decir, una especificidad que permita una sensibilidad razonable sin que un número excesivo de pacientes reciban resultados falsos positivos. Esta especificidad puede estar en el intervalo del 80-90%. Un método alternativo para obtener un umbral de ensayo es representar gráficamente la sensibilidad frente a la especificidad para diferentes umbrales de ensayo (curvas ROC) y después seleccionar el punto de inflexión de la curva.

Como alternativa a los umbrales individuales, el ensayo puede emplear intervalos de ensayo, que proporcionan diferentes grados de probabilidad de la presencia de la enfermedad y que tienen diferentes consecuencias clínicas asociadas a ellos. Por ejemplo, un ensayo puede tener tres intervalos; uno asociado con un alto riesgo (por ejemplo, 90%) de presencia de cáncer gástrico, un segundo asociado con un bajo riesgo de cáncer gástrico, y un tercero considerado como sospechoso de enfermedad. El intervalo "sospechoso" puede asociarse con una recomendación para repetir el ensayo en un periodo de tiempo definido.

Anticuerpos contra marcadores del cáncer gástrico

En la presente también se describe la preparación de anticuerpos contra GTM. Empleando los métodos descritos en la presente pueden identificarse nuevos GTM empleando métodos de micromatrices y/o qRT-PCR. Tras haber identificado un marcador putativo, este puede producirse en una cantidad suficiente para que pueda suscitar una respuesta inmunológica. En algunos casos, puede utilizarse un GTM de longitud completa, y en otros, un fragmento peptídico de un GTM puede ser suficiente como inmunógeno. El inmunógeno puede inyectarse en un hospedante adecuado (por ejemplo, ratón, conejo, etc.) y si se desea puede inyectarse un adyuvante, tal como adyuvante incompleto de Freund, para aumentar la respuesta inmunológica. Se apreciará que la preparación de anticuerpos es algo habitual en la técnica inmunológica y no es necesario describirla más fondo en la presente. Como resultado, se pueden producir anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales o de presentación de fagos, contra GTM identificados empleando los métodos descritos en la presente.

En otras realizaciones, pueden prepararse anticuerpos contra la proteína o el núcleo de la proteína de los marcadores tumorales identificados en la presente, o contra una secuencia oligonucleotídica exclusiva de un GTM. Aunque ciertas proteínas pueden estar glicosiladas, las variaciones en el patrón de glicosilación, en ciertas circunstancias, pueden conducir a la no detección de formas de GTM que no presentan los patrones de glicosilación habituales. Así, los inmunógenos de GTM pueden incluir GTM desglicosilado o fragmentos de GTM desglicosilados. La desglicosilación puede lograrse empleando una o más glicosidasas conocidas en la técnica. Como alternativa, el ADNc de GTM puede expresarse en líneas celulares deficientes en la glicosilación, tales como líneas de células procariontas, que incluyen *E. coli* y similares.

Pueden prepararse vectores que tengan en su interior oligonucleótidos que codifican GTM. Muchos de estos vectores pueden basarse en vectores convencionales conocidos en la técnica. Los vectores pueden utilizarse para transfectar una diversidad de líneas celulares para producir líneas celulares que producen GTM, que pueden emplearse para producir las cantidades deseadas de GTM para el desarrollo de anticuerpos específicos u otros reactivos para la detección de GTM o para la estandarización de ensayos desarrollados para GTM.

Kits

Basándose en los descubrimientos descritos en la presente pueden preverse y producirse varios tipos de kits de ensayo. En primer lugar, pueden fabricarse kits que tengan un dispositivo de detección precargado con una molécula de detección (o "reactivo de captura"). En realizaciones para la detección de ARNm de GTM, estos dispositivos pueden comprender un sustrato (por ejemplo, vidrio, silicio, cuarzo, metal, etc.) sobre el cual se unen oligonucleótidos como reactivos de captura que se hibridan con el ARNm que se va a detectar. En algunas realizaciones, puede lograrse la detección directa del ARNm mediante la hibridación del ARNm (marcado con cy3, cy5, un marcador radiactivo u otro marcador) a los oligonucleótidos sobre el sustrato. En otras realizaciones, puede lograrse la detección del ARNm fabricando, en primer lugar, un ADN complementario (ADNc) con el ARNm deseado. Después, el ADNc marcado puede hibridarse con los oligonucleótidos sobre el sustrato y detectarse.

Los anticuerpos también pueden emplearse en kits como reactivos de captura. En algunas realizaciones, un sustrato (por ejemplo, una placa de múltiples pocillos) puede tener unido un reactivo de captura específico de GTM. En algunas realizaciones, un kit puede incluir un reactivo bloqueante. Los reactivos bloqueantes pueden emplearse para reducir la unión no específica. Por ejemplo, la unión de oligonucleótidos no específicos puede reducirse empleando ADN en exceso proveniente de cualquier fuente adecuada que no contenga oligonucleótidos de GTM, tal como ADN de esperma de salmón. La unión de anticuerpos no específicos puede reducirse empleando un exceso de proteína bloqueante, tal como albúmina de suero. Se apreciará que en la técnica se conocen numerosos métodos para detectar oligonucleótidos y proteínas, y que puede emplearse cualquier estrategia que detecte específicamente moléculas asociadas con GTM.

Los anticuerpos también pueden emplearse cuando están unidos a un soporte sólido, por ejemplo, empleando un chip de anticuerpos, que permite la detección de múltiples marcadores con un único chip.

Además de un sustrato, un kit de ensayo puede comprender reactivos de captura (tales como sondas), disoluciones de lavado (por ejemplo SSC, otras sales, tampones, detergentes y similares), así como restos de detección (por ejemplo, cy3, cy5, marcadores radiactivos y similares). Los kits también pueden incluir instrucciones para su uso y un envase.

Los marcadores del cáncer pueden detectarse en una muestra empleando cualquier técnica adecuada y pueden incluir, pero no se limitan a sondas oligonucleotídicas, qPCR o anticuerpos generados contra marcadores del cáncer.

Se apreciará que la muestra que se va a ensayar no se limita a una muestra del tejido sospechoso de ser un tumor. El marcador puede ser segregado hacia el suero u otro fluido corporal. Por tanto, una muestra puede incluir cualquier muestra corporal, e incluye muestras de biopsias, sangre, suero, lavados peritoneales, fluido cerebroespinal, orina y deposiciones.

También se apreciará que la presente descripción no se limita a la detección del cáncer en seres humanos, sino que es adecuada para la detección del cáncer en cualquier animal que incluye, pero no se limita a perros, gatos,

caballos, ganado vacuno, ovejas, ciervos, cerdos y cualquier otro animal del cual se sabe que puede padecer cáncer.

Ensayos para marcadores del cáncer gástrico en fluidos corporales

5 En varias realizaciones, los ensayos para GTM pueden realizarse de modo deseable en muestras obtenidas de sangre, plasma, suero y fluido peritoneal obtenido, por ejemplo, empleando lavados peritoneales, u otros fluidos corporales, tales como orina, linfa, fluido cerebrospinal, fluido gástrico o muestras de deposiciones.

10 En general, los métodos de ensayo para detectar oligonucleótidos, proteínas y péptidos en estos fluidos son conocidos en la técnica. La detección de oligonucleótidos puede realizarse empleando métodos de hibridación, tales como transferencias Northern, transferencias Southern o métodos de micromatrices, o qPCR. Los métodos para
 15 detectar proteínas incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), chips de proteínas que portan anticuerpos, radioinmunoensayo de esferas en suspensión (RIA), transferencia Western y unión de lectina. Sin embargo, como ilustración, los niveles en fluidos de un GTM pueden cuantificarse empleando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo "sandwich" (ELISA). Para los ensayos de plasma, se añaden 5 uL de una parte alícuota de una muestra diluida de modo adecuado o un patrón de GTM diluido en serie y 75 uL de anticuerpo anti-GTM humano conjugado con peroxidasa a los pocillos de una placa de microtitulación. Después de un periodo de incubación de 30 minutos a 30 °C, los pocillos se lavan con 0,05% de Tween 20 en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar el anticuerpo no unido. Los complejos unidos de GTM y anticuerpo anti-GTM después se incuban con o-fenilendiamina que contiene H₂O₂ durante 15 a 30 °C. La reacción se detiene añadiendo H₂SO₄ 1 M y se mide la absorbancia a 492 nm con un lector de placas de microtitulación.

20 Se apreciará que los anticuerpos anti-GTM pueden ser anticuerpos monoclonales o antisuero policlonal. También se apreciará que puede estudiarse cualquier otro fluido corporal de modo adecuado.

No es necesario que un marcador se segregue, en sentido fisiológico, para que sea útil. Por el contrario, cualquier mecanismo mediante el cual un gen o proteína de marcador entra en el suero puede resultar eficaz para producir un nivel detectable y cuantificable del marcador. Así, la secreción normal de proteínas solubles desde las células, el desprendimiento de proteínas de membrana desde las membranas plasmáticas, la secreción de formas de ARNm cortadas y empalmadas de modo alternativo o las proteínas expresadas a partir de estas, y la muerte celular (que puede ser apoptótica) pueden producir unos niveles suficientes de marcador que sean útiles.

Cada vez existen más pruebas del uso de marcadores del suero como herramientas para diagnosticar y/o evaluar la eficacia de una terapia para una diversidad de tipos de cáncer.

30 Yoshikawa *et al.* (Cancer Letters, 151: 81-86 (2000) describen el inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz-1 en el plasma de pacientes con cáncer gástrico.

Rudland *et al.* (Cancer Research, 62: 3417-3427 (2002) describen la osteopontina como una proteína asociada a metástasis en el cáncer de mama humano.

35 Buckhaults *et al.* (Cancer Research, 61:6996-7001 (2002)) describen ciertos genes de la superficie celular y segregados en tumores colorrectales.

Kim *et al.* (JAMA, 287(13): 1671-1679 (2002)) describen la osteopontina como un biomarcador de diagnóstico potencial para el cáncer de ovario.

Hotte *et al.* (A.J. American Cancer Society, 95(3): 507-512 (2002)) describen la osteopontina plasmática como una proteína detectable en fluidos corporales humanos que está asociada con ciertas malignidades.

40 Martin *et al.* (Prostate Cancer Prostatic Dis., 9 de marzo, 2004 (PMID: 15007379) (resumen)) describen el uso de la calicreína 2 humana, el antígeno específico de próstata (PSA) y el PSA libre como marcadores para la detección del cáncer de próstata.

Hall *et al.* (Laryngoscope, 113(1): 77-81 (2003) (PMID: 12679418) (resumen)) describen el valor predictivo de la tiroglobulina de suero en el cáncer de tiroides.

45 Mazzaferri *et al.* (J. Clin. Endocrinol. Metab., 88(4): 1433-1441 (2003) (resumen)) describen la tiroglobulina como un método de control potencial para pacientes con carcinoma de tiroides.

Whitley *et al.* (Dim. Lab. Med., 24(1): 29-47 (2004) (resumen)) describen la tiroglobulina como un marcador sérico para el carcinoma de tiroides.

50 Kuo *et al.* (Clin. Chim. Acta., 294(1-2): 157-168 (2000) (resumen)) describen la metaloproteínasa de matriz-2 y -9 séricas en pacientes infectados por HCF y HBV.

Koopman *et al.* (Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev, 13(3): 487-491 (2004) (resumen)) describen la osteopontina como un biomarcador para el adenocarcinoma pancreático.

Pellegrini *et al.* (Cancer Immunol. Immunother., 49(7): 388-394 (2000) (resumen)) describen mediciones del antígeno carcinoembrionario soluble y TIMP 1 como marcadores para el cáncer colorrectal preinvasivo.

Melle *et al.* (Clin. Chem., 53(4), 629-635 (2007) (resumen)) describen HSP27 como marcador sérico para el adenocarcinoma pancreático.

- 5 Leman *et al.* (Urology, 69(4), 714-20 (2007) (resumen)) describen EPCA-2 como marcador sérico para el cáncer de próstata.

Tsigkou *et al.* (I. Clin. Endocrinol. Metab., 92(7), 2526-31 (2007) (resumen)) describen la inhibina total como marcador sérico potencial para el cáncer de ovario.

- 10 Marchi *et al.* (Cancer, 112, 1313-1324 (2008) (resumen)) describen la proapolipoproteína AI como marcador sérico de la metástasis cerebral en pacientes con cáncer de pulmón.

Métodos

Se emplearon los siguientes métodos generales para evaluar la idoneidad de diversas estrategias para la identificación molecular de marcadores asociados con tumores gástricos.

Recolección de tumores

- 15 Se recolectaron muestras de tumores gástricos y tejidos gástricos no malignos de especímenes quirúrgicos extraídos en Seoul National University Hospital. El diagnóstico del cáncer gástrico se realizó basándose en los síntomas, los descubrimientos físicos y el examen histológico de los tejidos.

Extracción de ARN

- 20 En algunas realizaciones, la expresión de genes asociados con los tumores gástricos se analizó determinando los niveles de ARN en muestras tomadas de tumores. Especímenes quirúrgicos congelados se introdujeron en medio OCT. Se cortaron secciones de 60 micrómetros de los bloques de tejidos empleando un microtomo, se homogeneizaron en una mezcla de TriReagent:agua (3:1), y después se extrajeron en cloroformo. Después el ARN total se purificó de la fase acuosa empleando el procedimiento RNeasy™ (Qiagen). En total, se extrajo ARN de 58 muestras de tumores gástricos y 58 muestras de tejido gástrico no maligno ("normal") y se empleó en el análisis de micromatrices descrito a continuación. También se extrajo ARN de 16 líneas de células de cáncer y se reunió para actuar como ARN de referencia.
- 25

Preparación de los portaobjetos de la micromatriz

- 30 Se obtuvieron portaobjetos de vidrio revestidos con epoxi en MWG Biotech AG, Ebersberg, Alemania, y fueron impresos con aproximadamente 30.000 oligonucleótidos 50-meros empleando un robot de construcción de micromatrices Gene Machines, según el protocolo del fabricante.

Marcaje e hibridación del ARN

- 35 El ADNc se transcribió a partir de 10 ug de ARN total empleando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) en reacciones que contenían 5-(3'-aminoalil)-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato. La reacción entonces se desionizó en una columna Microcon antes de incubarse con Cy3 o Cy5 en tampón bicarbonato durante 1 hora a temperatura ambiente. Los tintes no incorporados se retiraron empleando una columna Qiaquick (Qiagen) y la muestra se concentró hasta 15 ul en un SpeedVac. Entonces los ADNc marcados con Cy3 y Cy5 se mezclaron con tampón Ambion ULTRAhyb, se desnaturalizaron a 100 °C durante 2 minutos y se hibridaron con los portaobjetos de las micromatrices en cámaras de hibridación a 42 °C durante 16 horas. Los portaobjetos después se lavaron y se barrieron dos veces en un escáner Axon 4000A con dos ajustes de potencia para producir los datos de fluorescencia primarios sobre la expresión génica.
- 40

Procedimiento de normalización

- 45 Para medir la expresión de los genes del cáncer en tumores y tejidos no cancerosos, se corrigieron las medianas de las intensidades de fluorescencia mediante el software Genepix™ mediante la resta de las intensidades de fluorescencia del fondo local. Se excluyeron las manchas con una intensidad corregida del fondo menor que cero. Para facilitar la normalización, las proporciones de intensidad y las intensidades de las manchas globales se transformaron logarítmicamente. Las proporciones de intensidad transformadas logarítmicamente se corrigieron para el sesgo del tinte y espacial empleando una regresión local aplicada en el paquete LOCFIT™. Las proporciones de intensidad transformadas logarítmicamente se regresaron simultáneamente con respecto a la localización y la intensidad de las manchas global. Los residuales de la regresión local proporcionaron los cambios corregidos en número de veces logarítmicas. Para el control de calidad, las proporciones de cada micromatriz normalizada se representaron gráficamente con respecto a la intensidad de las manchas y la localización. Las gráficas después se inspeccionaron de modo visual para detectar posibles artefactos remanentes. Además, se aplicó un modelo de
- 50

análisis de la varianza (ANOVA) para la detección del sesgo de la punta de la horquilla. Todos los resultados y parámetros de la normalización se insertaron en una base de datos Postgres para el análisis estadístico.

Selección de los marcadores

5 Los datos de la expresión de genes en micromatrices para cada uno de los 29.718 genes se clasificaron según la intensidad relativa de la señal para cada gen en tejido tumoral y no maligno. Los posteriores análisis se limitaron a (i) los genes que codifican proteínas segregadas, (ii) los genes con una clasificación de intensidad en tejido tumoral mayor que la observada para el gen (CEACAM5) que codifica el marcador tumoral existente CEA, y (iii) los genes sin expresión significativa en sangre o tejido vascular, según se determina mediante los recuentos EST en la base de datos Unigene (Wheeler D.L. *et al.*, 2003). Se predijeron las proteínas segregadas identificando las transcripciones que se espera que contengan un péptido señal N-terminal. Las proteínas con hélices transmembrana previstas que no estaban en los 20 primeros aminoácidos N-terminales [Krogh A. *et al.*, 2001] se rechazaron. Se predijeron otras localizaciones subcelulares empleando TARGETP [Emanuelsson O. *et al.*, 2000].

15 Los números de referencia (MWG oligo n.º) para los oligonucleótidos pertinentes y las secuencias de referencia de proteínas y ARNm de NCBI de los GTM seleccionados se muestran en la figura 1. La figura 1 también muestra la clasificación de intensidad de los GTM en tejido tumoral y no maligno. A continuación se muestran las secuencias de ADN completas de los GTM de esta invención.

PCR a tiempo real cuantitativa

20 En otras realizaciones puede utilizarse una PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) para la cuantificación absoluta o relativa del número de copias del molde de PCR. El conjunto de cebadores para MUC17 (Directo: GAGGTGGTCAGCAGCATTGAC; Inverso: CCTGGGAAGAGTGGTTTTTAGC) se diseñó empleando Primer Express V 2.0TM (Applied Biosystems) y el producto amplificado se detectó empleando marcaje verde SYBR. El ZG16 se representa por el ensayo de expresión Assay-on-Demand™ Hs.00380609_ml (Applied Biosystems). La amplificación se realizó en un sistema de detección de secuencias ABI Prism™ 7000 bajo condiciones de ciclación convencionales.

25 Se realizaron ensayos en dos placas de 96 pocillos y cada muestra de ARN está representada por un único ADNc. Se analizaron hasta 45 muestras de ARN procedente de tumores gástricos y tejido gástrico no maligno. Cada placa contiene una curva patrón de ADNc de referencia, a lo largo de un intervalo de concentración de 625 veces, por duplicado. El análisis consiste en calcular el ΔCT (CT del gen diana - media del CT del ADNc de referencia). El ΔCT es directamente proporcional al cambio en número de veces log2 negativo. Los cambios en número de veces log2 con relación a la mediana del cambio en número de veces log2 no maligno se calcularon (cambio en número de veces log2 - mediana del cambio en número de veces log2 normal). Estos cambios en número de veces entonces se agruparon en clases de frecuencia y se representaron gráficamente.

Expresión de proteínas y generación de anticuerpos

35 Para validar ZG16 al nivel de proteínas fue necesario generar nuevos anticuerpos contra la proteína recombinante. La región codificadora 17-167 de ZG16 se amplificó mediante PCR a partir del ADNc de una línea celular humana empleando el cebador director CACCAATGCCATTCAGGCCAGGT y el cebador inverso TCAGCATCTGCTGCAGCTA. El producto de la PCR se purificó en gel y se clonó en el vector de entrada "Gateway" "pENTR/dTOPO" de Invitrogen antes de ser secuenciado para verificar la inserción correcta. Utilizando el sistema "Gateway", el ZG16 se clonó desde pENTR/dTOPO al vector de expresión de Invitrogen pDEST17 que contiene un marcador 6xHIS N-terminal. La expresión de ZG16 se realizó en células BL21-AI *E.coli* (Invitrogen), las células se cultivaron a 37 °C en un agitador hasta que alcanzaron la fase semilogarítmica ($OD_{600} = 0,5$), tras lo cual se indujeron a una concentración final de 0,2% de arabinosa y se cultivaron durante 3 horas más a 37 °C en un agitador. Las células se recolectaron mediante una centrifugación a 6000 x g durante 15 minutos y se rechazó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en PBS (pH 7,0) y se lisaron mediante sonicación empleando una célula Sonics Vibra a 60% de potencia. Las células lisadas se aclararon mediante una centrifugación a 12000 x g durante 10 minutos y se rechazó el sobrenadante. El sedimento celular se lavó tres veces en tampón PBS (pH 7,0) que contenía 0,5% de Triton X-100, seguido de un lavado con PBS (pH 7,0). Después, el sedimento se lavó otra vez más empleando urea 8 M en PBS (pH 7,0). Cada etapa de lavado se aclaró mediante una centrifugación a 12000 x g y se rechazó el sobrenadante. Después el sedimento se solubilizó en tampón de solubilización que contenía TRIS 10 mM (pH 8,0), urea 8 M, NaCl 100 mM durante la noche a temperatura ambiente. El tampón de solubilización se volvió a centrifugar a 12000 x g, se filtró a través de una membrana de 0,45 μm y se cargó en una columna de NiSepharose prelavada con tampón de lavado que contenía PBS (pH 7,0), urea 8 M e imidazol 20 mM. Después de cargar, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado y las proteínas solubilizadas se eluyeron en tampón de lavado, suplementado con imidazol 500 mM. Las proteínas eluidas se desalaron en PBS (pH 7,0) y tampón urea 8 M y después se volvieron a plegar mediante la dilución gota a gota en tampón de replegamiento que contenía acetato de sodio 50 mM (pH 4,5), NDSB-201 0,1 M, glicerol al 10%, GSH/GSSH 1 mM/0,1 mM. El tampón de replegamiento se aclaró mediante centrifugación a 12000 x g y las proteínas replegadas se concentraron utilizando filtros Centriprep con un límite de exclusión nominal de 10 KDa (Millipore). Las proteínas replegadas se sometieron a un intercambio de tampón en un tampón que contenía acetato de sodio 100 mM (pH

5,0) suplementado con glicerol al 10% empleando una columna de desalación G25 y se conservaron partes alícuotas a -80 °C. El análisis de un gel de SDS al 10%-PAGE con tinción de Coomassie y un análisis de la transferencia Western indicaron colectivamente la presencia de una proteína marcada con His de 18 KDa con hasta 95% de pureza. La banda teñida con Coomassie de 18 KDa se cortó, y se determinó mediante MALDI-TOF/TOF MS/MS que contenía ZG16.

Se obtuvieron anticuerpos contra ZG16 mediante inmunoadsorción de un banco de anticuerpos de presentación de fagos con la proteína ZG16 purificadas (Antibodies by Design; una división de Morphosys AG, Alemania, www.morphosys.com).

Micromatrices de anticuerpos

Se emplearon matrices de anticuerpos para validar los marcadores candidatos. Se obtuvieron muestras de suero de pacientes con cáncer gástrico, cáncer colorrectal (antes y después de una cirugía) y de pacientes quirúrgicos con una enfermedad no maligna. Las muestras fueron entregadas por Dunedin Public Hospital, Nueva Zelanda, y el banco de tejidos de the Christchurch Cancer Society, Christchurch, Nueva Zelanda. Los anticuerpos contra ZG16 y MUC17 que se obtuvieron de fuentes comerciales o se seleccionaron de bancos de fagos (Morphosys) se imprimieron sobre portaobjetos de vidrio (Schott Nexterion Slide H) empleando el robot de matrices GeneMachines OmniGrid 100. Cada matriz se rodeó con un trazo de un rotulador hidrófobo. Los portaobjetos después se lavaron en 3X PBS-0,5% de Tween 20 (3X PBS-T) antes de bloquear con etanolamina 50 mM en tampón borato de sodio 50 mM, pH 8,0, seguido de un tampón bloqueante de caseinato (3X PBS-T, caseinato de sodio al 1%). Entonces se añadieron las muestras de suero marcadas con biotina a los portaobjetos antes de una incubación durante la noche a 4 °C. Después los portaobjetos se lavaron en 3X PBS-T antes de secarse al aire. Después se detectó el anticuerpo unido empleando una amplificación de círculo rodante (RCA), en gran medida tal como se ha descrito previamente (Haab B.B., Lizardi P.M., RCA-enhanced protein detection arrays, *Methods Mol. Biol.*, 2006, 328: 15-29). Brevemente, los portaobjetos se incubaron con anticuerpos anti-biotina que se habían conjugado con un cebador oligonucleotídico (5' - CCT GGT GCT CAA ATT TCA GTT CTG C - 3'). Entonces un molde de ADN circular se hibridó con los portaobjetos a 37 °C durante 30 min en una cámara sellada humidificada antes de lavar los portaobjetos en concentraciones decrecientes de PBS-T (3X PBS-0,05% de Tween 20, 1X PBS-0,05% de Tween 20 y 0,1X PBS-0,05% y Tween 20) y se secaron. Después el molde se extendió empleando phi29 a 30 °C durante 3 hr antes de la lavar los portaobjetos y secar mediante centrifugación. El molde amplificado después se detectó empleando sondas marcadas con fluorescencia homólogas. Los portaobjetos se barrieron con un escáner Axon 4000A y se midió la señal con el software GenePix Pro 6.1.0.4.

Se ajustó la intensidad de fluorescencia de Cy5 empleando una normalización de cuantiles, empleando la función `normalizeBetweenArrays` del paquete `limma` (Smith, 2005) para R (el paquete R para el cálculo estadístico (R Development Core). La normalización de cuantiles ajusta los valores de las intensidades de modo que la distribución de las intensidades es la misma para cada bloque (cada bloque se corresponde con una muestra distinta) ajustando los cuantiles de las intensidades de los diferentes bloques al mismo valor. La clasificación de cada valor de intensidad no cambia durante este procedimiento, solo la magnitud relativa de las intensidades. Se supone que la función de distribución de probabilidad subyacente que describe el intervalo de concentración de antígeno es la misma para todas las muestras. Este procedimiento mejora el promedio de correlación de señales entre bloques a través de todas las muestras y también cuando se consideran solo los bloques de referencia, lo cual indica una mejora en la calidad de los datos. Las manchas marcadas con GenePix se retiraron antes de tomar la mediana a través de los duplicados para obtener las intensidades normalizadas para cada anticuerpo.

Así, los inventores han identificado tres genes y/o proteínas que son útiles para desarrollar reactivos, dispositivos y kits para detectar y evaluar el cáncer gástrico. Pueden utilizarse uno o más marcadores, por sí solos o en combinación para proporcionar un ensayo molecular fiable para el cáncer gástrico.

45 Ejemplos

Los ejemplos descritos en esta memoria son con propósito de ilustrar realizaciones de la invención. Otras realizaciones, métodos y tipos de análisis están dentro del alcance de los expertos en las técnicas de diagnóstico molecular y no necesitan describirse con más detalle en la presente.

Ejemplo 1: Identificación de marcadores para una malignidad gástrica

Se seleccionaron marcadores empleando los datos de expresión génica obtenidos de las muestras de tumores gástricos y no malignos. Se emplearon los siguientes criterios para la selección de marcadores: (i) la presencia de una secuencia señal característica de una proteína segregada, (ii) la clasificación de intensidad de la señal de la micromatriz en el tejido tumoral, y (iii) los niveles de EST correspondientes en la sangre o en tejidos vasculares. El uso de estos criterios permite la identificación de marcadores segregados que se expresan en abundancia en tejido tumoral, pero que es probable que tengan un fondo bajo en suero, sangre o plasma. La figura 1 ofrece una tabla que muestra los tres marcadores para la malignidad gástrica seleccionados empleando los anteriores criterios, MUC5AC, MUC17 y ZG16. La figura 1 incluye el símbolo para el gen ("símbolo"), el MWG oligo n.º, el número de secuencia de referencia de ARNm de NCBI, el número de secuencia de referencia de la proteína, la clasificación de intensidad del

gen en las micromatrices obtenidas empleando tejido tumoral, y la clasificación de intensidad del gen en las micromatrices obtenidas empleando tejido no maligno. Los tres GTM mostraban una mayor clasificación de expresión (intensidad) que CEACAM5, el gen que codifica el marcador del cáncer gástrico existente CEA. La clasificación de expresión más baja posible es de 29.718. El estudio de la clasificación también demuestra que la expresión de estos GTM en tejido tumoral es comparable al tejido no maligno, lo cual indica que los genes no habían sido fuertemente infrarregulados durante la carcinogénesis. Los recuentos Unigene EST (Wheeler *et al.*, 2003) para los tres GTM en sangre y tejido vascular fueron todos cero.

Ejemplo 2: Análisis de qRT-PCR

Se confirmó la abundancia e identidad de los GTM ZG16 y MUC17 en tejido tumoral empleando la técnica de cuantificación de expresión génica más sensible y precisa qPCR. Hasta 45 muestras de tumores gástricos y el mismo número de muestras de tejido gástrico no maligno de los mismos pacientes se analizó mediante RT-qPCR empleando los cebadores y las sondas descritas en la sección de métodos. La expresión de estos genes se cuantificó empleando el número de ciclos de PCR necesarios para alcanzar un nivel umbral de amplificación del producto (Ct).

El análisis de qPCR confirmó los datos de las matrices: ambos marcadores se detectaron con facilidad en tejido tumoral mediante qPCR y no se obtuvieron pruebas de una disminución significativa en la expresión en tejido tumoral, comparado con tejido no maligno. La abundancia de estos ARN en tejido tumoral, comparado con tejido no maligno, se ilustra mediante los histogramas en la figura 2a-b.

Ejemplo 3: Detección de proteínas de marcadores de tumores gástricos en suero

En ciertas realizaciones, la detección de proteínas de GTM puede lograrse empleando anticuerpos dirigidos contra la proteína completa, un fragmento de la proteína (péptido) o el núcleo de la proteína. Los métodos para detectar y cuantificar la expresión de proteínas y péptidos son conocidos en la técnica y pueden incluir métodos que se basan en anticuerpos específicos generados contra la proteína o el péptido. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales y antiseros policlonales empleando métodos que son muy conocidos en la técnica y no es necesario describirlos con más detalle en la presente.

Para detectar los GTM en suero, los anticuerpos contra los GTM se imprimieron sobre portaobjetos de vidrio empleando un robot Gene Machine OmniGrid[™]. Cada anticuerpo se repitió 8 veces en la matriz. Después se marcaron con biotina muestras de suero procedentes de 33 pacientes con cáncer gástrico y 41 controles antes de ser incubadas con los portaobjetos de anticuerpos. Las proteínas unidas se detectaron con anticuerpos anti-biotina y la señal se amplificó empleando amplificación de círculo rodante (RCA) y marcaje fluorescente. La cantidad de proteína unida se cuantificó empleando un escáner Axon 4000a y el software Genepix 6.1.0.4. Las características de los pacientes se muestran en la figura 2.

La señal fluorescente de cada anticuerpo en la matriz se normalizó y la señal de la mediana para los 8 duplicados se expresa en unidades fluorescentes arbitrarias. En la figura 3 se muestran diagramas de cajas que ilustran los datos. La señal de la mediana para MUC 17 fue de 18.836 AU para pacientes con cáncer gástrico, y de 16.130 para el grupo control. Estas medianas fueron significativamente diferentes ($p = 0,007$). Se observaron diferencias significativas entre las medianas para los dos anticuerpos de ZG16 de presentación de fagos (5902 y 5905) obtenidos en MorphoSys. La señal de la mediana para ZG16_5902 en las muestras de pacientes con cáncer gástrico fue de 2139 AU, comparado con 1837 AU para los controles; la mediana de la señal de ZG16_5905 en pacientes fue de 3063 AU, comparado con 1675 AU para los controles. La señal de la mediana entre pacientes y controles para ambos ZG16_5902 y ZG16_5905 fue significativamente diferente ($p = 0,05$ y $p = 0,005$, respectivamente).

Estos datos demuestran que MUC17 y ZG16 están presentes a niveles significativamente mayores en el suero de pacientes con cáncer gástrico que en los controles. Se logrará una mayor diferenciación entre los grupos de pacientes y control refinando el procedimiento de ensayo inmunológico, la identificación de anticuerpos con mayor especificidad para los antígenos diana y el uso de combinaciones de marcadores.

Ejemplo 4: Células transfectadas con vectores que contienen GTM

En otras realizaciones, se proporcionan células que pueden expresar GTM, fragmentos de GTM o marcadores de péptidos. Pueden utilizarse células procariotas y eucariotas. Por ejemplo, puede emplearse *E. coli* (una célula procariota) para producir grandes cantidades de GTM que carecen de glicosilación madura (si el GTM concreto normalmente está glicosilado). Pueden utilizarse células COS, células 293 y una diversidad de otras células eucariotas para producir GTM que estén glicosilados, o que tengan un plegamiento adecuado y, por tanto, la estructura tridimensional de la forma nativa de la proteína de GTM. Los métodos para transfectar estas células son muy conocidos en la técnica y no es necesario describirlos con más detalle en la presente.

55

Ejemplo 5: Kits

5 Basándose en los descubrimientos descritos en la presente pueden producirse varios tipos de kits de ensayo. En primer lugar, pueden fabricarse kits que tengan un dispositivo de detección precargado con una molécula de detección (o "reactivo de captura"). En realizaciones para la detección de ARNm de GTM, estos dispositivos pueden comprender un sustrato (por ejemplo, vidrio, silicio, cuarzo, metal, etc.) sobre el cual se unen oligonucleótidos como reactivos de captura que se hibridan con el ARNm que se va a detectar. En algunas realizaciones, puede lograrse la detección directa del ARNm mediante la hibridación del ARNm (marcado con cy3, cy5, un marcador radiactivo u otro marcador) a los oligonucleótidos sobre el sustrato. En otras realizaciones, puede lograrse la detección del ARNm fabricando, en primer lugar, un ADN complementario (ADNc) con el ARNm deseado. Después, el ADNc marcado puede hibridarse con los oligonucleótidos sobre el sustrato y detectarse.

10 Independientemente del método de detección empleado, la comparación de la expresión del GTM de ensayo con una medición patrón de expresión resulta deseable. Por ejemplo, la expresión del ARN puede estandarizarse a ADN celular total, a la expresión de ARN expresados de forma constitutiva (por ejemplo, ARN ribosómico) o a otros marcadores relativamente constantes.

15 Los anticuerpos también pueden emplearse en kits como reactivos de captura. En algunas realizaciones, un sustrato (por ejemplo, una placa de múltiples pocillos) puede tener unido un reactivo de captura específico de GTM. En algunas realizaciones, un kit puede incluir un reactivo bloqueante. Los reactivos bloqueantes pueden emplearse para reducir la unión no específica. Por ejemplo, la unión de oligonucleótidos no específicos puede reducirse empleando ADN en exceso proveniente de cualquier fuente adecuada que no contenga oligonucleótidos de GTM, tal como ADN de esperma de salmón. La unión de anticuerpos no específicos puede reducirse empleando un exceso de proteína bloqueante, tal como albúmina de suero. Se apreciará que en la técnica se conocen numerosos métodos para detectar oligonucleótidos y proteínas, y que puede emplearse cualquier estrategia que detecte específicamente moléculas asociadas con GTM.

20 En realizaciones que se basan en la detección de anticuerpos, las proteínas o los péptidos de GTM pueden expresarse sobre una base de una célula, o sobre una base de proteína en fluido, tejido o celular total, volumen de fluido, masa de tejido (peso). Además, los GTM en suero puede expresarse basándose en una proteína sérica relativamente muy abundante, tal como la albúmina.

25 Además de un sustrato, un kit de ensayo puede comprender reactivos de captura (tales como sondas), disoluciones de lavado (por ejemplo, SSC, otras sales, tampones, detergentes y similares), así como restos de detección (por ejemplo, cy3, cy5, marcadores radiactivos y similares). Los kits también pueden incluir instrucciones para su uso y un envase.

30 Aunque esta invención se describe con referencia a sus realizaciones específicas, puede apreciarse que pueden emplearse otras realizaciones que implican el uso de los marcadores descritos.

Aplicabilidad industrial

35 Los métodos para detectar miembros de la familia de GTM incluyen la detección de ácidos nucleicos que emplean micromatrices y/o métodos de PCR a tiempo real y detección de proteínas y péptidos. Las composiciones y los métodos descritos en la presente son útiles para la fabricación de dispositivos de diagnóstico y kits, el diagnóstico de enfermedades, la evaluación de la eficacia de una terapia, y para producir reactivos adecuados para medir la expresión de miembros de la familia de GTM en muestras biológicas.

40

Listado de secuencias

<110> Pacific Edge Biotechnology Limited

5 <120> Marcadores para la detección del cáncer gástrico

<130> 231672PCT

<160> 6

10 <170> Patent versión 3.3

<210> 1

<211> 18750

15 <212> ADN

<213> Humano

<400> 1

```

atgtcgctgc agttcaatgg gtttgtgctg tgtgatcaca cggtcctgcc cacagagctg      60
aatgggctat tggggtttcc ttggaggctg ctgagggaca gggcactctt ccccgccgtc      120
cacacaatga gtgttgccg gaggaagctg gccctgctct gggccctggc tctcgctctg      180
gcctgcaccg ggcaacacagg ccatgcccag gatggctcct ccgaatccag ctacaagcac      240
caccctgcc tctctcctat cgcccggggg cccagcgggg tcccgcctcg tggggcgact      300
gtcttcccat ctctgaggac catccctgtg gtacgagcct ccaaccggc gcacaacggg      360
cgggtgtgca gcacctgggg cagcttcac tacaagacct tcgacggcga cgtcttccgc      420
ttcccggcc tctgcaacta cgtgttctcc gagcactgct gtgccgccta cgaggatttt      480
aacatccagc tacgccgag ccaggagtca gcggcccaca cgctgagcag ggtcctcatg      540
aagggtgatg gcgtggctcat ccagctgacc aagggtctcg tcctggtcaa cggccacccg      600
gtcctgctgc ccttcagcca gtctggggtc ctcatcagc agagcagcag ctacaccaag      660
gtggaggcca ggtgggctt tgtcctcatg tggaaaccag atgacagcct gctgctggag      720
ctggacacca aatacgccaa caagacctgt gggctctgtg gggacttcaa cgggatgcc      780
gtggtcagcg agctcctctc ccacaacacc aagctgacac ccattggaatt cgggaacctg      840
cagaagatgg acgacccac ggagcagtgt caggacctg tcctgaacc cccgaggaac      900
tgctccactg gctttggcat ctgtgaggag ctctgcacg gccagctgtt ctctggctgc      960
gtggccctgg tggacgtcgg cagctacctg gaggcttga ggcaagacct ctgcttctgt      1020
gaagacaccg acctgctcag ctgctctgac cacaccttg ccgagtactc ccggcagtgc      1080
acccatgacg gggggttggc ccaggactgg cggggccctg acttctgccc ccagaagtgc      1140
cccaacaaca tgcagtacca cgagtccgc tccccctgct cagacacctg ctccaaccag      1200
gagcactccc gggcctgtga ggacctgt gtggccggct gcttctgccc tgaggggacg      1260
gtgcttgacg acatcgccca gaccggctgt gtccctgtgt caaagtgtgc ctgctgttac      1320
aacggggctg cctatgcccc aggggcccacc tactccacag actgcaccaa ctgcacctgc      1380
tccggaggcc ggtggagctg ccaggaggtt ccattgcccgt gtacctgctc tgtgcttggg      1440
ggtgcccact tctcaactgt tgacgggaag caatacagcg tgcacggcga ctgcagctat      1500
gtgctgacca agccctgtga cagcagtgcc ttcactgtac tggctgagct gcgcaggtgc      1560

```

20

ES 2 581 841 T3

gggctgacgg acagcgagac ctgcctgaag agcgtgacac tgagcctgga tggggcgag 1620
 acggtggtgg tgatcaaggc cagtggggaa gtgttctga accagatcta caccagctg 1680
 cccatctctg cagccaacgt caccatcttc agaccctcaa ccttcttcat catcgcccag 1740
 accagcctgg gcctgcagct gaacctgcag ctggtgccca ccatgcagct gttcatgcag 1800
 ctggcgccca agctccgtgg gcagacctgc ggtctctgtg ggaacttcaa cagcatccag 1860
 gccgatgact tccggaccct cagtgggggt gtggaggcca ccgctgcggc cttcttcaac 1920
 acctcaaga cccaggccgc ctgcccac atcaggaaca gcttcgagga cccctgctct 1980
 ctgagcgtgg agaatgcccc caggatgggt gccccgagcg cgtgccggac gctggtgtg 2040
 gctctggcgg ccattgctct ggtgccgcag gcagagacc agggccctgt ggagccgagc 2100
 tgggagaatg cagggcacac catggatggc ggtgccccga cgtcctcgcc caccggcgc 2160
 gtgagctttg ttccaccctg cactgtcttc cccagcctga gccgtaagca gatgctgcc 2220
 ctgccagccg ggaaggggtg gtttccagt cccaaagggt ggggcccaga tctaggggtg 2280
 cagctgccac cagccctgaa cccggcgcac aatggcggg tgtgcagcac ctggggtgac 2340
 ttccactaca agaccttga cggcgacgtc ttccgcttc ctggccttg caactacgtg 2400
 ttctctgagc actgccgcgc cgcctacgag gacttcaacg tccagctacg ccgaggccta 2460
 gtgggctcca ggctgtggt caccctgtt gtcattcaagg cccaggggct ggtgctggag 2520
 gcgtccaacg gctccgtcct catcaatggg cagcgggagg agctgcctta cagccgact 2580
 ggctcctgg tggagcagag cggggactac atcaaggta gcatccggct ggtgctgaca 2640
 ttctgtgga acggagagga cagtgcctg ctggagctgg atcccaaata cgccaaccag 2700
 acctgtggcc tgtgtgggga cttcaacggc ctcccggcct tcaacgagt ctatgccac 2760
 aacgcaggc tgaccccgt ccagtttgg aacctgcaga agttggatgg gccacggag 2820
 cagtgccgg acccgctgcc cttgccggc ggcaactgca cggacgagga gggcatctgc 2880
 caccgaccc tgcctgggccc ggcttttgc gagtgccacg cactggtgga cagcactgcg 2940
 tacctggccg cctgcgccc ggacctgtgc cgctgcccc cctgcccgtg tgccacctt 3000
 gtggaatact cacgccagt cggccacgc gggggccagc cgcggaactg gaggtgcct 3060
 gagctctgcc cccggacctg cccctcaac atgcagcacc aggagtgtg ctcacctgc 3120
 acggacacct gctccaacc ccagcgcgc cagctctgc aggacctg tgtggacggc 3180
 tgcttctgcc cccaggcag gtctgcacg gtgctggatg acatcacgca ctctggctgc 3240
 ctgcccctg ggcagtgcc ctgcaccac ggcggccgca cctacagccc gggcacctcc 3300
 ttcaacacca cctgcagctc ctgcacctgc tccggggggc tatggcagt ccaggacctg 3360
 ccgtgcctg gcacctgtc tgtcagggc ggggccaca tctccaccta tgatgagaaa 3420
 ctctacgacc tgcatggtga ctgcagctac gttctgtcca agaatgtgc cgacagcagc 3480
 ttaccgtgc tggctgagct gcggaagtgc ggcctgacgg acaacgagaa ctgcctgaaa 3540
 gcggtgacgc tcagcctgga cggcggggac acggccatcc gggccaagc ggacggcggc 3600

ES 2 581 841 T3

gtgttcctca actccatcta cacgcagctg cccctgtcgg cagccaacat caccctgttc 3660
 acaccctcga gcttcttcat cgtggtgcag acaggcctcg ggctgcagct gctggtgcag 3720
 ctggtgccac tcatgcaggt gtttgtcagg ctggaccccg cccaccaggg ccagatgtgc 3780
 ggcctgtgtg ggaacttcaa ccagaaccag gctgacgact tcacggccct cagcggggtg 3840
 gtggaggcca cgggcgcagc cttcgccaac acctggaagg cccaggctgc ctgtgccaat 3900
 gccaggaaca gctttgagga cccctgctcc ctacgtgtgg agaatgagaa ctacgcccgg 3960
 cactggtgct cgcgcctgac cgatcccaac agtgcccttct cgcgctgcca ctccatcatc 4020
 aaccccaagc ccttccactc gaactgcatg tttgacacct gcaactgtga gcggagcgag 4080
 gactgcctgt gcgccgcgct gtcctcctac gtgcacgcct gtgccgcaa gggcgtacag 4140
 ctacgcgact ggagggacgg cgtctgcacc aagtacatgc agaactgccc caagtccag 4200
 cgctacgcct acgtggtgga tgcctgccag cccacttgcc gcggcctgag tgaggccgac 4260
 gtcacctgca gcgtttcctt cgtgcctgtg gacggctgca cctgccccgc gggcaccttc 4320
 ctcaatgacg cgggcgcctg tgtccccgcc caggagtgcc cctgctacgc tcacggcacc 4380
 gtgctggctc ctggagaggt ggtgcacgac gagggcgccg tgtgttcatg tacgggtggg 4440
 aagctaagct gcctgggagc ctctctgcag aaaagcacag ggtgtgcagc ccccatggtg 4500
 tacctggact gcagcaacag ctcggcgggc acccctgggg ccgagtgcct ccggagctgc 4560
 cacacgctgg acgtgggctg tttcagcaca cactgcgtgt ccggctgtgt ctgtccccg 4620
 gggctggtgt cggatgggag tgggggctgc attgccgagg aggactgccc ctgtgtgcac 4680
 aacgaggcca cctacaagcc tggagagacc atcagggtcg actgcaacac ctgcacctgc 4740
 aggaaccgga ggtgggagtg cagccaccgg ctctgcctgg gcacctgctg ggcctacggg 4800
 gatggccact tcatcacctt tgatggcgat cgctacagct ttgaaggcag ctgcgagtac 4860
 atcttggccc aggactactg tggggacaac accaccacg ggaccttccg catcgtcacc 4920
 gagaacatcc cctgtgggac caccggcacc acctgctcca aggccatcaa gctcttcgtg 4980
 gaggtgagaa cggccccagc tgtgagcacc cccgacctg cagccaacga gccggcccc 5040
 agggaagctt cggtcggctt ccggcagcgt ctgcctcccc tgcagagcta cgagctgatc 5100
 ctccaagagg ggacctttaa ggcggtggcg agagggccgg gtggggaccc accctacaag 5160
 atacgctaca tggggatctt cctggtcatc gagaccacg ggatggccgt gtcctgggac 5220
 cggaagacca gcgtgttcat ccgactgcac caggactaca agggcagggt ctgcggcctg 5280
 tgcgggaact tcgacgaaa tgccatcaat gactttgcca cgcgtagccg gtccgtggtg 5340
 ggggacgcac tggagtgtg gaaacagctgg aagctctccc cctcctgccc ggacgccctg 5400
 gcacccaagg acccctgcac ggccaacccc ttccgcaagt cctgggcca gaagcagtgc 5460
 agcatcctcc acggccccac cttcgccgcc tgccgctccc aggttgactc caccaagtac 5520
 tacgaggcct gcgtgaacga cgcgtgtgcc tgcgactcgg gtggcgactg cgagtgttc 5580
 tgacaggctg tggctgccta cgccaggcc tgccacgacg cgggcctgtg tgtgtcctgg 5640
 cggactccgg acacctgccc cttgttctgt gacttttaca acccacatgg gggctgtgag 5700

ES 2 581 841 T3

tggcactacc agccctgcgg ggcaccctgc ctaaaaacct gccggaaccc cagtgggcac 5760
 tgcctggtgg acctgcctgg cctggaaggc tgctaccga agtgcccacc cagccagccc 5820
 ttcttcaatg aggaccagat gaagtgcgtg gcccagtgtg gctgctacga caaggacgga 5880
 aactactatg acgtcgggtc aagggtcccc acagcggaga actgccagag ctgtaactgc 5940
 acaccagtg gcatccagtg cgctcacagc cttgaggcct gcacctgcac ctatgaggac 6000
 aggacctaca gctaccagga cgctcatctac aacaccaccg atgggcttgg cgctgcttg 6060
 atcgccatct gcggaagcaa cggcaccatc atcaggaagg ctgtggcatg tcctggaact 6120
 ccagccacaa cgccattcac cttcaccacc gcctgggtcc cccactccac gacaagcccg 6180
 gccctcccgg tctccaccgt gtgtgtccgc gaggtctgcc gctggctcag ctggtacaat 6240
 gggcaccgcc cagagcccgg cctgggaggc ggagactttg agacgtttga aaacctgagg 6300
 cagagagggg accaggtatg ccctgtgctg gctgacatcg agtgccgggc ggcgcagctt 6360
 cccgacatgc cgctggagga gctgggccag caggtggact gtgaccgcat gcgggggctg 6420
 atgtgcgcca acagccaaca gagtcccccg ctctgtcacg actacgagct gcgggttctc 6480
 tgctgcgaat acgtgccctg tgccccctcc ccggccccag gcaccagccc tcagccctcc 6540
 ctcagtgcc a gcacggagcc tgctgtgcct accccaacct agaccacagc aaccgaaaag 6600
 accaccctat ggggtgacccc gagcatccgg tcgacggcgg ccctcacctc gcagactggg 6660
 tccagctcag gccccgtgac ggtcaccccc tcggccccag gtaccaccac ctgccagccc 6720
 cgggtgctagt ggacagagtg gtttgatgag gactaccca agtctgaaca acttgagggg 6780
 gacgttgagt cctacgataa gatcagggcc gctggagggc acttatgcca gcagcctaag 6840
 gacatagagt gccaggccga gagcttcccc aactggacc tggcacaggt ggggcagaag 6900
 gtgactgtg acgtccactt cggcctggtg tgcaggaact gggagcagga gggcgtcttc 6960
 aagatgtgct acaactacag gatccgggtc ctctgtgca gtgacgacca ctgcagggga 7020
 cgtgccacaa cccccccacc gaccacagag ctggagacgg ccaccaccac caccacccag 7080
 gccctgttct caacgcgca gcctacgagt agccccgggc tgaccagggc tccccggcc 7140
 agcaccacag cagtccccac cctctcagaa ggactgacat cccccagata cacaagcacc 7200
 cttggtacag ccaccacggg aggccccacg acgctgcag gctccacaga acccactgtc 7260
 ccaggggtgg ccacatccac cttccaaca cgctcagccc ttccagggac gacggggagc 7320
 ttgggcacat ggcgccccctc acagccacc acgctggccc caacaacaat ggcaacctcc 7380
 agagctcgcc cgacaggcac agccagcacc gttccaaag agccgctgac cacgagcctg 7440
 gcgccaacac tcacgagcga gctgtccacc tctcaggccg agaccagcac gccaggaca 7500
 gagcagacaa tgagcccctt gactaacacc accaccagcc agggcacgac ccgctgtcaa 7560
 ccgaagtgtg agtggacaga gtggtttgac gtggacttcc caacctcagg ggttgacggc 7620
 ggggacatgg aaacttttga aaacatcagg gctgctgggg gcaagatgtg ctgggcacca 7680
 aagagcatag agtgccgggc ggagaactac cccgaggtaa gcatcgacca ggtcgggcag 7740

gtgctgacct gcagcctgga gacggggctg acctgcaaga acgaagacca gacaggcagg 7800
 ttcaacatgt gcttcaacta caacgtgcgt gtgctttgct gtgacgacta cagccactgc 7860
 cccagtacc cagccaccag ctccacggcc acgcccctct caactccggg gacgacctgg 7920
 atcctcaca agccgaccac aacagccact acgactgcgt cactggatc cacggccacc 7980
 ccgacctca ccctgagaac agtccccct cccaaagtgc tgaccaccac ggccaccaca 8040
 cccacagtca ccagctcaa agccactccc tctccagtc cagggactgc aaccgccctt 8100
 ccagactga gaagcacagc caccacacc acagctacca gcgttacacc catccccct 8160
 tctccctgg gcaccacctg gaccgccta tcacagacca ccacaccac ggccaccatg 8220
 tccacagcca caccctctc cactccagag actgccaca cctccacagt gcttaccgcc 8280
 acggccacca caactggggc caccggctct gtggccacc cctcctccac cccaggaaca 8340
 gctcacacta ccaaagtgc aactaccaca accacgggct tcacagccac cccctcctcc 8400
 agcccagga cggcactcac gcctccagt tggatcagca caaccaccac acccacaacc 8460
 agaggctcca cggtgacccc ctctccatc cggggacca cccacaccgc cacagtgctg 8520
 accaccacca ccacaactgt ggccactggt tctatggcaa caccctctc tagcacacag 8580
 accagtggga ccaccacac accccagtg ccgaacacca tggccaccac acacgggcga 8640
 tccctgccc ccagcagtc ccacacggt cgcacagct ggacttcggc cacctcgggc 8700
 atcttgggca ccaccacat cacagagcct tccacggtga ctcccacac cctagcagca 8760
 accaccgta ccaccagca ctgcactca gccctttcca gccctcacc tagcagcaga 8820
 accaccgagt cccccctc tccagggacg accaccggg gccacaccac ggccacctcc 8880
 aggaccacag ccacggccac acccagcaag acccgcacct cgaccctgct gcccagcagc 8940
 cccacatcg ccccataac cacggtggt accatgggct gtgagccca gtgtgcctgg 9000
 tcagagtggc tggactacag ctacccatg ccggggccct ctggcgggga ctttgacacc 9060
 tactcaaca tccgtgcggc cggagggggt gtctgtgagc agcccctggg cctcagtgct 9120
 cgtgccagg cccagcctgg tgtccccctg cgggagttgg gccaggtcgt ggaatgcagc 9180
 ctggactttg gcctggtctg caggaaccgt gagcaggtgg ggaagttcaa gatgtgctc 9240
 aactatgaaa tccgtgtgtt ctgctgcaac tacggccact gcccagcac cccggccacc 9300
 agctctacgg ccagtcctc ctccactccg gggacgacct ggatcctcac agagctgacc 9360
 acaacagcca ctacgactga gtccactgga tccacggcca ccccgctc caccaccagg 9420
 accacctgga tctcacaaga gccgagcact acagccaccg tgacggtgcc caccggatcc 9480
 acggccaccg cctcctccac ccaggcaact gctggcacc cacatgtgag caccacggcc 9540
 acgacacca cagtcaccag ctcaaagcc actccctct cagtcaccag gactgcaacc 9600
 gcccttccag cactgagaag cacagccacc acaccacag ctaccagctt tacagccatc 9660
 cctcctctc ccctgggac cacctggacc cgcctatcac agaccaccac acccagggc 9720
 accatgtcca cagccacacc ctctccact ccagagactg tccacacct cacagtgctt 9780
 accaccacgg ccaccacaac cggggccacc ggctctgtgg ccacccctc ctccaccca 9840

ES 2 581 841 T3

ggaacagctc aactaccaa agtgctgact accacaacca cgggcttcac agccaccccc 9900
 tcctccagcc cagggacggc acgcacgctt ccagtgctga tcagcacaac caccacaccc 9960
 acaaccagag gttccacggt gacccccctc tccatcccgg ggaccaccca cccccca 10020
 gtgctgacca ccaccaccac aactgtggcc actggttcta tggcaacacc ctctctagc 10080
 acacagacca gtgggaccac ccacacaccc ccagtgccga acaccacggc caccacacac 10140
 gggcgatccc tgtccccag cagtccccac acggtgcgca cagcctggac ttcggccacc 10200
 tcaggcacct tgggcaccac ccacatcaca gagccttcca cggggacttc ccacaccca 10260
 gcagcaacca ccggtaccac ccagcactcg actccagccc tgtccagccc tcaccctagc 10320
 agcaggacca ccgagtcacc cccttctcca gggacgacca ccccgggcca caccagggcc 10380
 acctccagga ccacggccac ggccacaccc agcaagacc gcacctcgac cctgctgccc 10440
 agcagcccca catcgcccc aataaccacg gtggtgacca tgggctgtga gccccagtgt 10500
 gcctggtcag agtggctgga ctacagctac cccatgccgg ggccctctgg cggggacttt 10560
 gacacctact ccaacatccg tgcggccgga ggggccgtct gtgagcagcc cctgggcttc 10620
 gagtgccgtg cccaggccca gcctggtgtc cccctgcggg agttgggcca ggtcgtgga 10680
 tgcagcctgg actttggcct ggtctgcagg aaccgtgagc aggtgggga gttcaagatg 10740
 tgcttcaact atgaaatccg tgtgttctgc tgcaactacg gccactgccc cagcaccctg 10800
 gccaccagct ctacggccac gccctcctcc actccagggg cagcctggat cctcacagag 10860
 cagaccacag cagccactac gaccgcaacc actggatcca cggccatccc gtcctccacc 10920
 ccgggaacag ctccccctcc caaagtgtg accagcacgg ccaccacacc cacagccacc 10980
 agttccaaag ccacttctc ctccagtcca aggactgcaa ccacccttc agtgctgaca 11040
 agcacagcca ccaaatccac agctaccagc ttacaccca tccccctct cacccttggg 11100
 accaccggga ccctcccaga acagaccacc acaccatgg ccaccatgtc cacaatccac 11160
 ccctcctcca ctccggagac caccacaccc tccacagtgc tgaccacgaa ggccaccacg 11220
 acaagggcca ccagttccat gtccaccccc tcctccactc cggggacgac ctggatcctc 11280
 acagagctga ccacagcagc cactacaact gcagccactg gccccacggc caccctgctc 11340
 tccaccccag ggaccacctg gatcctcaca gagcccagca ctacagccac cgtgacggtg 11400
 cccaccggat ccacggccac cgcctcctcc acccgggcaa ctgctggcac cctcaaagtg 11460
 ctgaccagca cggccaccac accacagtc atcagctcca gagccactcc ctctccagt 11520
 ccagggactg caaccgacct tccagcactg agaagcacag ccaccacacc cacagctacc 11580
 agcgttacag ccatccccctc ttctcctctg ggcaccgctt ggaccgcct atcacagacc 11640
 accacaccca cggccaccat gtccacagcc acaccctct ctactccaga gactgtccac 11700
 acctccacag tgcttaccac cagcaccacc acaaccaggg ccaccggctc tgtggccacc 11760
 ccctcctcca cccaggaac agctcacact accaaagtgc cgactaccac aaccacgggc 11820
 ttcacagcca cccccctc cagcccaggg acggcactca cgcctccagt gtggatcagc 11880

ES 2 581 841 T3

acaaccacca caccacaac cagaggctcc acggtgacce cctcctccat cccggggacc 11940
 acccacaccg ccacagtgtc gaccaccacc accacaactg tggccactgg ttctatggca 12000
 acaccctect ctacacacac gaccagtggg accaccacac caccaccagt gccgaacacc 12060
 acggccacca cacacgggag gtccttgccc cccagcagtc cccacacggt gcgcacagcc 12120
 tggacttcgg ccacctcggg catcttgggc accaccacac tcacagagcc ttccacggtg 12180
 acttcccaca cccagcagc aaccaccagt accaccacag actcgactcc agccctgtcc 12240
 agccctcacc ctacacagc gaccaccgag tcacccctt ctcaggagc gaccaccccg 12300
 ggccacacca ggggcacctc caggaccaca gccacagcca caccagcaa gaccgcacc 12360
 tcgaccctgc tgccagcag ccccatctg gccccataa ccacggtggt gaccacgggc 12420
 tgtgagcccc agtgtgcctg gtcagagtgg ctggactaca gctaccccat gccggggccc 12480
 tctggcgggg actttgacac ctactccaac atccgtgcgg ccggaggggc agtctgtgag 12540
 cagcccctgg gcctcagtg ccgtgcccag gccagcctg gtgtccccct gcgggagttg 12600
 gcccaggtcg tggaatgcag cctggacttt ggctgtgtc gcaggaaccg tgagcaggtg 12660
 ggggaagtca agatgtgctt caactatgaa atccgtgtgt tctgctgcaa ctacggccac 12720
 tgccccagca cccggccac cagctctac gccacgccct cctcaactcc ggggacgacc 12780
 tggatcctca caaagtgcac cacaacagcc actacgactg agtccactgg atccacggcc 12840
 acccgtcct ccacccagc gaccacctg atcctcacag agccgagcac tacagccacc 12900
 gtgacggtgc ccaccgatc cacggccacc gcctcctcca cccaggcaac tgctggcacc 12960
 ccacatgtga gcaccacggc cacgacacc acagtcacca gctccaaagc cactcccttc 13020
 tccagtccag ggactgcaac cgcccttcca gactgagaa gcacagccac cacaccacac 13080
 gctaccagct ttacagccat cccctcctcc tccctgggca ccacctggac ccgcctatca 13140
 cagaccacca caccacggc caccatgtcc acagccacac cctcctccac tccagagact 13200
 gcccacacct ccacagtgtc taccaccag gccaccacaa ccagggccac cggctctgtg 13260
 gccacccct cttccacccc aggaacagct cacactacca aagtgccgac taccacaacc 13320
 acgggcttca cagtcacccc ctctccagc ccagggacgg cacgcacgcc tccagtgtgg 13380
 atcagcaca ccaccacacc cacaaccagt ggctccacgg tgacccctc ctccgtcccg 13440
 gggaccaccc acacccccc agtctgacc accaccacca caactgtggc cactggttct 13500
 atggcaacac cctcctctag cacacagacc agtgggacca cccacacacc cccagtgccg 13560
 aacaccacgg ccaccacaca cgggcatcc ctgtcccca gcagtccca cacggtgcgc 13620
 acagcttga cttcggccac ctacggcacc ttgggacca cccacatcac agagccttcc 13680
 acggggactt cccacacccc agcagcaacc accggtacca cccagcactc gactccagcc 13740
 ctgtccagcc ctaccctag cagcaggacc accgagtcac ccccttccc agggacgacc 13800
 acccggggcc acaccacggc cacctccag accacggcca cggccacacc cagcaagacc 13860
 cgcacctcga ccctgtgcc cagcagcccc acatcggccc ccataaccac ggtggtgacc 13920
 acgggctgtg agccccagtg tgctgtgca gagtggctgg actacagcta ccccatgccg 13980

ES 2 581 841 T3

gggccctctg gcggggactt tgacacctac tccaacatcc gtgcggccgg aggggcccgtc 14040
 tgtgagcagc ccctgggacct cgagtgccgt gcccaggccc agcctggtgt ccccttgggg 14100
 gagggtggcc aggtcgtgga atgcagcctg gactttggcc tggctctgag gaaccgtgag 14160
 cagggtggga agttcaagat gtgcttcaac tatgaaatcc gtgtgttctg ctgcaactac 14220
 ggccactgcc ccagcaccac gccaccagc tctacggcca tgccctcctc cactccgggg 14280
 acgacctgga tcctcacaga gctgaccaca acagccacta cgactgcatc cactggatcc 14340
 acggccacc cgtcctccac cccgggaaca gctccccctc ccaaagtgt gaccagcccg 14400
 gccaccacac ccacagccac cagttccaaa gccacttctt cctccagtcc aaggactgca 14460
 accacccttc cagtgtgac aagcacagcc accaaatcca cagctaccag cgttacacc 14520
 atccccctt ccacccttg gaccaccggg acctcccag aacagaccac cacaccctg 14580
 gccaccatgt ccacaatcca cccctcctcc actccggaga ccaccacac ctccacagt 14640
 ctgaccacga aggccaccac gacaagggcc accagttcca cgtccacccc ctctccact 14700
 ccggggacga cctggatcct cacagagctg accacagcag ccactacaac tgcagccact 14760
 ggccccacgg ccaccctgct ctccaccca gggaccacct ggatcctcac agagctgacc 14820
 acaacagcca ctacgactgc gtccactgga tccacggcca ccccgctctc caccacagg 14880
 accacctgga tcctcacaga gccgagcact acagccaccg tgacggtgct caccggatcc 14940
 acggccaccg cctcctccac ccaggcaact gctggcacc cacatgtgag caccacggcc 15000
 acgacacca cagtcaccag ctccaaagcc actccctcct ccagtccagg gactgcaact 15060
 gcccttccag cactgagaag cacagccacc acaccacag ctaccagctt tacagccatc 15120
 cctcctcct ccctgggac cacctggacc cgctatcac agaccaccac acccagggcc 15180
 accatgtcca cagccacacc ctctccact ccagagactg tccacacctc cacagtgtt 15240
 accgccacgg ccaccacaac cggggccacc ggctctgtgg ccaccctc ctccaccca 15300
 ggaacagctc aactaccaa agtgccgact accacaacca cgggcttcc agccacccc 15360
 tcctccagc caggacggc actcagcct ccaaccacca caccatgtc caccatgtcc 15420
 acaatccaca cctcctctac tccagagacc acccacact ccacagtgt gaccaccaca 15480
 gccaccatga caagggccac caattccag gccacacct cctccactct ggggacgacc 15540
 cggatcctca ctgagctgac cacaacagc actacaactg cagccactgg atccacggcc 15600
 accctgtcct ccaccacagg gaccacctg atctcacag agccgagcac tatagccacc 15660
 gtgatggtgc ccaccggttc cacggccacc gcctcctcca ctctgggaac agctcacacc 15720
 cccaaagtgg tgaccaccat ggccactatg cccacagcca ctgcctccac ggttcccagc 15780
 tcgtccaccg tggggaccac ccgaccctt gcagtgtcc ccagcagcct gccaaccttc 15840
 agcgtgtcca ctgtgtcctc ctacgtcctc accaccctga gaccactgg cttccccagc 15900
 tcccacttct ctactccctg cttctgcagg gcatttggac agttttctc gcccgggaa 15960
 gtcatctaca ataagaccga ccgagccggc tgccatttct acgcagtgtg caatcagcac 16020

ES 2 581 841 T3

tgtgacattg accgcttcca gggcgcctgt cccacctccc caccgccagt gtcctccgcc 16080
 ccgctgtcct cgcctcccc tgccctggc tgtgacaatg ccatccctct ccggcaggtg 16140
 aatgagacct ggaccctgga gaactgcacg gtggccaggt gcgtgggtga caaccgtgtc 16200
 gtcctgtggt acccaaagcc tgtggccaac gtcacctgcg tgaacaagca cctgccccatc 16260
 aaagtgtcgg acccgagcca gccctgtgac ttccactatg agtgcgagtg tgagtgcgtc 16320
 ggtggcccggt ggattacccc gggggcaggc atctgcagca tgtggggcgg ctcccactat 16380
 tccacctttg acggcacctc ttacacctc cggggcaact gcacctatgt cctcatgaga 16440
 gagatccatg cacgctttgg gaatctcagc ctctacctgg acaaccacta ctgcacggcc 16500
 tctgccactg ccgctgccgc tgccgcccgc tgccccgcg ccctcagcat ccaactacaag 16560
 tccatggata tcgtcctcac tgtcaccatg gtgcatggga aggaggaggg cctgatcctg 16620
 tttgacaaa ttccggtgag cagcgtttc agcaagaacg gcgtgcttgt gtctgtgctg 16680
 gggaccacca ccatgcgtgt ggacattcct gccctggcg tgagcgtcac cttcaatggc 16740
 caagtcttc aggccggct gccctacagc ctcttcaca acaacaccga gggccagtgc 16800
 ggcacctgca ccaacaacca gagggacgac tgtctccagc gggacggaac cactgccgcc 16860
 agttgcaagg acatggccaa gacgtggctg gtccccgaca gcagaaagga tggctgctgg 16920
 gccccgactg gcacaccccc cactgccagc cccgcagccc cgggtgtctag cacacccacc 16980
 cccaccccat gccaccaca gccgctctgt gatctgatgc tgagccaggt ctttgctgag 17040
 tgccacaacc ttgtgcccc gggccattc ttcaacgcct gcacagcga ccaactgcagg 17100
 ggccgccttg aggtgccctg ccagagcctg gaggcttacg cagagctctg ccgcgcccgg 17160
 ggagtgtgca gtgactggcg aggtgcaacc ggtggcctgt gcgacctcac ctgcccacc 17220
 accaaagtgt acaagccatg cggccccata cagcctgcca cctgcaactc taggaaccag 17280
 agccacagc tggaggggat ggcggaggc tgcttctgcc ctgaggacca gatcctctc 17340
 aacgcacaca tgggcatctg cgtgcaggcc tgcccctgcg tgggaccga tgggttcct 17400
 aaatttccc gggagcgggt ggtcagcaac tgccagtcct gcgtgtgtga cgagggtca 17460
 gtgtcggtgc agtgaagcc cctgccctgt gacgccaggt gtcagcccc gccgtgcaac 17520
 cgtcccggct tcgtaaccgt gaccaggccc cgggccgaga acccctgctg ccccgagacg 17580
 gtgtgcgtgt gcaacacaac cacctgcccc cagagcctgc ctgtgtgccc gccagggcag 17640
 gagtccatct gacccagga ggagggcgac tgctgtccca ccttccgctg cagacctcag 17700
 ctgtgtctgt acaatggcac cttctacggg gttggtgcaa ccttcccagg cgccctccc 17760
 tgccacatgt gtacctgcct ctctggggac acccaggacc caacggtgca atgtcaggag 17820
 gatgcctgca acaatactac ctgtccccag ggctttgagt acaagagagt ggccgggcag 17880
 tgctgtgggg agtgcgtcca gaccgcctgc ctacgcccg atggccagcc agtccagctg 17940
 aatgaaacct gggtaacag ccatgtggac aactgcaccg tgtacctctg tgaggctgag 18000
 ggtgagtc atttgctgac cccacagcct gcacctgcc cagatgtgtc cagctgcagg 18060
 gggagcctca gaaaaccgg ctgctgctac tcctgtgagg aggactcctg tcaagtccgc 18120

ES 2 581 841 T3

atcaacacga ccacccctgtg gcaccagggc tgcgagaccg aggtcaacat caccttctgc 18180
gagggctcct gccccggagc gtccaagtac tcagcagagg cccaggccat gcagcaccag 18240
tgcacctgct gccaggagag gcgggtccac gaggagaccg tgcccttgca ctgtcctaac 18300
ggctcagcca tcctgcacac ctacaccac gctgtccagg tcctctgtgg gctgcttgcc 18360
tggggcctgc aggctggagg acacatccgg ggggcagtcc aggacccca gcagccactg 18420
aaggaccagg aagcctctgg gaaggccagg caggggggtg gctacaggca gaccgtggcc 18480
tggggagaca aaagcaatgc tcgtgcctgg ctgcagaagc ctgtggtgtg ggtgcagagc 18540
ggggccttcc ccacaccggg gcctgcctct gccctgtgcc cttggaaaat gggcattcag 18600
cctgaaacca ccaagcagct cagagatgct aacatcctga aggagagcaa acgctccatc 18660
agtagagaaa gacaaaggca atgtgtctaa gctatcaggt ttaatagagg atttgaggga 18720
cagatctgga aatctcaacg ctttttctag 18750

<210> 2
<211> 14360
5 <212> ADN
<213> Humano

<400> 2

tttcgccagc tcctctgggg gtgacaggca agtgagacgt gctcagagct ccgatgccaa 60
ggccaggggac catggcgctg tgtctgctga ccttggctct ctcgctcttg cccccacaag 120
ctgctgcaga acaggacctc agtgtgaaca gggctgtgtg ggatggagga ggggtcatct 180
cccaagggga cgtcttgaac cgtcagtgcc agcagctgtc tcagcacggt aggacaggtt 240
ctgcggaaca caccgccaca ggtacaacat ctacaaatgt cgtggagcca agaattgatt 300
tgagttgcag caccaaccct gagatgacct cgattgagtc cagtgtgact tcagacactc 360
ctggtgtctc cagtaccagg atgacaccaa cagaatccag aacaacttca gaatctacca 420
gtgacagcac cacacttttc cccagttcta ctgaagacac ttcatctcct acaactcctg 480
aaggcaccga cgtgcccatg tcaacaccaa gtgaagaaag catttcatca acaatggctt 540
ttgtcagcac tgcacctctt cccagttttg aggcctacac atctttaaca tataaggttg 600
atatgagcac acctctgacc acttctactc aggcaagttc atctcctact actcctgaaa 660
gcaccaccat acccaaatca actaacagtg aaggaaagcac tccattaaca agtatgcctg 720
ccagcaccat gaagggtggc agttcagagg ctatcacctt tttgacaact cctgttgaaa 780
tcagcacacc tgtgaccatt tctgctcaag ccagttcatc tcctacaact gctgaaggtc 840
ccagcctgtc aaactcagct cctagtggag gaagcactcc attaacaaga atgcctctca 900
gcgtgatgct ggtggtcagt tctgaggcta gcacccttcc aacaactcct gctgccacca 960
acattcctgt gatcacttct actgaagcca gttcatctcc tacaacggct gaaggcacca 1020
gcataccaac ctcaacttat actgaaggaa gcactccatt aacaagtacg cctgccagca 1080
ccatgccggt tgccacttct gaaatgagca cactttcaat aactcctggt gacaccagca 1140
10 cactgtgac cacttctact gaaccagtt cacttctac aactgctgaa gctaccagca 1200

ES 2 581 841 T3

tgctaacctc aactcttagt gaaggaagca ctccattaac aaatatgcct gtcagcacca 1260
 tattggtggc cagttctgag gctagcacca cttcaacaat tcctggtgac tccaaaactt 1320
 ttgtgaccac tgctagttaa gccagctcat ctcccacaac tgctgaagat accagcattg 1380
 caacctcaac tcctagttaa ggaagcactc cattaacaag tatgcctgtc agcaccactc 1440
 cagtggccag ttctgaggct agcaaccttt caacaactcc tgttgactcc aaaactcagg 1500
 tgaccacttc tactgaagcc agttcatctc ctccaactgc tgaagttaac agcatgccaa 1560
 cctcaactcc tagtgaagga agcactccat taacaagtat gtctgtcagc accatgccgg 1620
 tggccagttc tgaggctagc accctttcaa caactcctgt tgacaccagc acacctgtga 1680
 ccacttctag tgaagccagt tcatcttcta caactcctga aggtaccagc ataccaacct 1740
 caactcctag tgaaggaagc actccattaa caaacatgcc tgtcagcacc aggtggtgg 1800
 tcagttctga ggctagcacc acttcaacaa ctctgtctga ctccaacact tttgtgacca 1860
 cttctagtga agctagttaa tcttctacaa ctgctgaagg taccagcatg ccaacctcaa 1920
 cttacagtga aagaggcact acaataacaa gtatgtctgt cagcaccaca ctggtggcca 1980
 gttctgaggc tagcaccctt tcaacaactc ctggtgactc caacactcct gtgaccactt 2040
 caactgaagc cacttcatct tctacaactg cggaaggtac cagcatgcca acctcaactt 2100
 atactgaagg aagcactcca ttaacaagta tgctgtcaa caccacactg gtggccagtt 2160
 ctgaggctag caccctttca acaactcctg ttgacaccag cacactgtg accacttcaa 2220
 ctgaagccag ttctctcctt acaactgctg atggtgcccag tatgccaaacc tcaactccta 2280
 gtgaaggaag cactccatta acaagtatgc ctgtcagcaa aacgctggtg accagttctg 2340
 aggttagcac ctttcaaca actcctcttg acacaagcac acatatacacc acttctactg 2400
 aagccagttg ctctcctaca accactgaag gtaccagcat gccaatctca actcctagtg 2460
 aaggaagtc tttattaaca agtatactg tcagcatcac accggtgacc agtcctgagg 2520
 ctagcaccct ttcaacaact cctgttgact ccaacagtcc tgtgaccact tctactgaag 2580
 tcagttcatc tcctacacct gctgaaggta ccagcatgcc aacctcaact tatagtgaag 2640
 gaagaactcc ttaacaagt atgcctgtca gcaccacact ggtggccact tctgcaatca 2700
 gcacccttc acaactcct gttgacacca gcacacctgt gaccaattct actgaagccc 2760
 gttcgtctcc tacaacttct gaaggtacca gcatgccaac ctcaactcct ggggaaggaa 2820
 gcactccatt aacaagtatg cctgacagca ccacgccggt agtcagttct gaggctagaa 2880
 cacttctagc aactcctggt gacaccagca cacctgtgac cacttctact gaagccactt 2940
 catctctac aactgctgaa ggtaccagca taccaacctc gactcctagt gaaggaacga 3000
 ctccattaac aagcacacct gtcagccaca cgctggtggc caattctgag gctagcacc 3060
 tttcaacaac tcctggtgac tccaacactc ctttgaccac ttctactgaa gccagttcac 3120
 ctctccac tgctgaaggt accagcatgc caacctcaac tcctagttaa ggaagcactc 3180
 cattaacacg tatgcctgtc agcaccacaa tgggtggccag ttctgaaacg agcacactt 3240

ES 2 581 841 T3

caacaactcc tgctgacacc agcacacctg tgaccactta ttctcaagcc agttcatctt 3300
ctacaactgc tgacggtacc agcatgccaa cctcaactta tagtgaagga agcactccac 3360
taacaagtgt gcctgtcagc accaggctgg tggtcagttc tgaggctagc accctttcca 3420
caactcctgt cgacaccagc atacctgtca ccacttctac tgaagccagt tcatctccta 3480
caactgctga aggtaccagc ataccaacct cacctcccag tgaaggaacc actccggttag 3540
caagtatgcc tgtcagcacc acgctgggtg tcagttctga ggctaacacc ctttcaacaa 3600
ctcctgtgga ctccaaaact cagggtggcca cttctactga agccagttca cctcctccaa 3660
ctgctgaagt taccagcatg ccaacctcaa ctcctggaga aagaagcact ccattaacaa 3720
gtatgcctgt cagacacacg ccagtggcca gttctgaggc tagcaccctt tcaacatctc 3780
ccgttgacac cagcacacct gtgaccactt ctgctgaaac cagttcctct cctacaaccg 3840
ctgaaggtag cagcttgcca acctcaacta ctagtgaagg aagtactcta ttaacaagta 3900
tacctgtcag caccacgctg gtgaccagtc ctgaggctag caccctttta acaactcctg 3960
ttgacactaa aggtcctgtg gtcacttcta atgaagttag ttcatctcct acacctgctg 4020
aaggtaccag catgccaaacc tcaacttata gtgaaggaag aactccttta acaagtatac 4080
ctgtcaacac cacactggtg gccagttctg caatcagcat cttttcaaca actcctggtg 4140
acaacagcac acctgtgacc acttctactg aagcctgttc atctcctaca acttctgaag 4200
gtaccagcat gccaaactca aatcctagtg aaggaaccac tccgtaaca agtatacctg 4260
tcagaccac gccggtagtc agttctgagg ctagcaccct ttcagcaact cctggtgaca 4320
ccagacccc tgggaccact tctgctgaag ccacttcac tcctacaact gctgaaggta 4380
tcagcatacc aaactcaact cctagtgaag gaaagactcc attaaaaagt atacctgtca 4440
gcaacagcc ggtggccaat tctgaggcta gcacccttc aacaactcct gttgactcta 4500
acagtctgt ggtcacttct acagcagtca gttcatctcc tacacctgct gaaggtagca 4560
gcatagcaat ctcaacgcct agtgaaggaa gcactgcatt aacaagtata cctgtcagca 4620
ccacaacagt ggccagttct gaaatcaaca gcctttcaac aactcctgct gtcaccagca 4680
cacctgtgac cacttattct caagccagtt catctcctac aactgctgac ggtaccagca 4740
tgaaaacctc aacttatagt gaaggaagca ctccactaac aagtttgctt gtcagacca 4800
tgctgggtgt cagttctgag gctaacacc tttcaacaac ccctattgac tccaaaactc 4860
aggtgaccgc ttctactgaa gccagttcat ctacaaccgc tgaaggtagc agcatgacaa 4920
tctcaactcc tagtgaagga agtcctctat taacaagtat acctgtcagc accacgccgg 4980
tggccagtc tgaggctagc accctttcaa caactcctgt tgaactcaac agtcctgtga 5040
tcacttctac tgaagtcagt tcatctccta cacctgctga aggtaccagc atgccaacct 5100
caacttatac tgaaggaaga actcctttta caagtataac tgtcagaaca acaccggtgg 5160
ccagctctgc aatcagcacc ctttcaacaa ctcccgttga caacagcaca cctgtgacca 5220
cttctactga agcccgttca tctcctacaa cttctgaagg taccagcatg ccaaactcaa 5280
ctcctagtga aggaaccact ccattaacaa gtatacctgt cagcaccacg ccggtactca 5340

ES 2 581 841 T3

gttctgaggc tagcacccct tcagcaactc ctattgacac cagcacccct gtgaccactt 5400
 ctactgaagc cacttcgtct cctacaactg ctgaaggtag cagcatacca acctcgactc 5460
 ttagtgaagg aatgactcca ttaacaagca cacctgtcag ccacacgctg gtggccaatt 5520
 ctgaggctag caccctttca acaactcctg ttgactctaa cagtcctgtg gtcacttcta 5580
 cagcagtcag ttcattctct acacctgctg aaggtagcag catagcaacc tcaacgccta 5640
 gtgaaggaag cactgcatta acaagtatac ctgtcagcac cacaacagtg gccagttctg 5700
 aaaccaacac cctttcaaca actcccgtg tcaccagcac acctgtgacc acttatgctc 5760
 aagtcagttc atctctaca actgctgacg gtagcagcat gccaacctca actcctaggg 5820
 aaggaaggcc tccattaaca agtatacctg tcagcaccac aacagtgagg agttctgaaa 5880
 tcaacaccct ttaacaact cttgctgaca ccaggacacc tgtgaccact tattctcaag 5940
 ccagttcatt tcctacaact gctgatggta ccagcatgcc aacccagct tatagtgaag 6000
 gaagcactcc actaacaagt atgcctctca gcaccacgct ggtggtcagt tctgaggcta 6060
 gcactcttcc cacaactcct gttgacacca gcactcctgc caccacttct actgaaggca 6120
 gttcattctc tacaactgca ggaggtacca gcatacaaac ctcaactcct agtgaacgga 6180
 ccactccatt agcaggtatg cctgtcagca ctacgcttgt ggtcagttct gagggtaaca 6240
 cctttcaac aactcctggt gactccaaa ctcaggtgac caattctact gaagccagtt 6300
 catctgcaac cgctgaagg agcagcatga caatctcagc tcctagtga ggaagtctc 6360
 tactaacaag tatacctctc agcaccacgc cggtagccag tcctgaggct agcaccctt 6420
 caacaactcc tgttgactcc aacagtctg tgatcacttc tactgaagtc agttcatctc 6480
 ctatacctac tgaaggtagc agcatgcaa cctcaactta tagtgacaga agaactcctt 6540
 taacaagtat gcctgtcagc accacagtg tggccagttc tgcaatcagc accctttcaa 6600
 caactcctgt tgacaccagc acacctgtga ccaattctac tgaagcccgt tcatctcta 6660
 caacttctga aggtaccagc atgccaacct caactcctag tgaaggaagc actccattca 6720
 caagtatgcc tgtagcacc atgcccgtg ttacttctga ggctagcacc ctttcagcaa 6780
 ctctgttga caccagcaca cctgtgacca cttctactga agccacttca tctctacaa 6840
 ctgctgaagg taccagcata ccaacttcaa ctcttagtga aggaacgact ccattaacaa 6900
 gtatacctgt cagccacacg ctggtggcca attctgagg tagcacccct tcaacaactc 6960
 ctggtgactc caacactcct ttcactact ctactgaagc cagttcacct cctcccactg 7020
 ctgaaggtag cagcatgcca acctcaact ctagtgaagg aaacactcca ttaacacgta 7080
 tgcctgtcag caccacaatg gtggccagtt ttgaaacaag cacactttct acaactcctg 7140
 ctgacaccag cacacctgtg actacttatt ctcaagccgg ttcattctct acaactgctg 7200
 acgatactag catgccaacc tcaacttata gtgaaggaag cactccacta acaagtgtgc 7260
 ctgtcagcac catgcccgtg gtcagttctg aggctagcac ccattccaca actcctgttg 7320
 acaccagcac acctgtcacc acttctactg aagccagttc atctctaca actgctgaag 7380

ES 2 581 841 T3

gtaccagcat accaacctca cctcctagtg aaggâaccac tccgttagca agtatgcctg 7440
 tcagcaccac gccggtggtc agttctgagg ctggcacctt tccacaact cctggtgaca 7500
 ccagcacacc tatgaccact tctactgaag ccagttcatc tcctacaact gctgaagata 7560
 tcgtcgtgcc aatctcaact gctagtgaag gaagtactct attaacaagt atacctgtca 7620
 gcaccacgcc agtggccagt cctgaggcta gcaccctttc aacaactcct gttgactcca 7680
 acagtccctg ggtcacttct actgaaatca gttcatctgc tacatccgct gaaggtacca 7740
 gcatgcctac ctcaacttat agtgaaggaa gcactccatt aagaagtatg cctgtcagca 7800
 ccaagccggt ggccagttct gaggctagca ctctttcaac aactcctgtt gacaccagca 7860
 tacctgtcac cacttctact gaaaccagtt catctcctac aactgcaaaa gataccagca 7920
 tgccaatctc aactcctagt gaagtaagta cttcattaac aagtatactt gtcagcacca 7980
 tgccagtggc cagttctgag gctagcaccc tttcaacaac tcctggtgac accaggacac 8040
 ttgtgaccac ttccactgga accagttcat ctctacaac tgctgaaggc agcagcatgc 8100
 caacctcaac tcctggtgaa agaagcactc cattaacaaa tatacttgtc agcaccacgc 8160
 tgttggccaa ttctgaggct agcacccttt caacaactcc tgttgacacc agcacacctg 8220
 tcaccacttc tgctgaagcc agttcttctc ctacaactgc tgaaggtacc agcatgcaaa 8280
 tctcaactcc tagtgatgga agtactccat taacaagtat acttgtcagc acctgcccag 8340
 tggccagttc tgaggctagc accgtttcaa caactgctgt tgacaccagc atacctgtca 8400
 ccaactctac tgaagccagt tcctctccta caactgctga agttaccagc atgccaacct 8460
 caactcctag tgaacaagc actccattaa ctagtatgcc tgtcaaccac acgccagtg 8520
 ccagttctga ggctggcacc ctttcaaaa ctctgttga caccagcaca cctgtgacca 8580
 cttctactaa agccagttca tctcctacaa ctgctgaagg tatcgtcgtg ccaatctcaa 8640
 ctgctagtga aggaagtact ctattaacaa gtatactgt cagcaccacg ccggtggcca 8700
 gttctgaggc tagcaccctt tcaacaactc ctggtgatac cagcatactt gtcaccactt 8760
 ctactgaagg cagttcttct cctacaactg ctgaaggtag cagcatgcca atctcaactc 8820
 ctagtgaagt aagtactcca ttaacaagta tacttgtcag caccgtgcca gtggccggtt 8880
 ctgaggctag cacccttca acaactcctg ttgacaccag gacacctgtc accacttctg 8940
 ctgaagctag ttcttctcct acaactgctg aaggtagcag catgccaatc tcaactcctg 9000
 gcgaaagaag aactccatta acaagtatgt ctgtcagcac catgccggtg gccagttctg 9060
 aggctagcac ctttcaaga actcctgctg acaccagcac acctgtgacc acttctactg 9120
 aagccagttc ctctctaca actgctgaag gtaccggcat accaatctca actcctagtg 9180
 aaggaagtac tccattaaca agtatactg tcagcaccac gccagtggtc attcctgagg 9240
 ctagcaccct ttcaacaact cctggtgact ccaacagtcc tgggtcact tctactgaag 9300
 tcagttcatc tcctacacct gctgaaggta ccagcatgcc aatctcaact tatagtgaag 9360
 gaagcactcc attaacaggt gtgcctgtca gcaccacacc ggtgaccagt tctgcaatca 9420
 gcaccctttc aacaactcct gttgacacca gcacacctgt gaccacttct actgaagccc 9480

ES 2 581 841 T3

attcatctcc tacaacttct gaaggtacca gcatgccaac ctcaactcct agtgaaggaa 9540
 gtactccatt aacatatatg cctgtcagca ccatgctggt agtcagttct gaggatagca 9600
 ccctttcagc aactcctggt gacaccagca cacctgtgac cacttctact gaagccactt 9660
 catctacaac tgtgaaggt accagcattc caacctcaac tcctagttaa ggaatgactc 9720
 cattaactag tgtacctgtc agcaacacgc cgggtggccag ttctgaggct agcatccttt 9780
 caacaactcc tgttgactcc aacactcctt tgaccacttc tactgaagcc agttcatctc 9840
 ctcccactgc tgaaggtacc agcatgcca cctcaactcc tagtgaagga agcactccat 9900
 taacaagtat gcctgtcagc accacaacgg tggccagttc tgaacgagc accctttcaa 9960
 caactcctgc tgaccaccagc acacctgtga ccacttattc tcaagccagt tcatctcctc 10020
 caattgtcga cgggtactagc atgccaacct caacttatag tgaaggaagc actccactaa 10080
 caaatatgtc tttcagcacc acgccagtggt tcagttctga ggctagcacc ctttcacaa 10140
 ctctgttga caccagcaca cctgtcacca cttctactga agccagttta tctcctacaa 10200
 ctgctgaagg taccagcata ccaacctcaa gtcctagtga aggaaccact ccattagcaa 10260
 gtatgcctgt cagcaccacg ccggtgggtca gttctgagggt taacaccctt tcaacaactc 10320
 ctgtggactc caacactctg gtgaccactt ctactgaagc cagttcatct cctacaatcg 10380
 ctgaaggtag cagcttgcca acctcaacta ctagtgaagg aagcactcca ttatcaatta 10440
 tgctctcag taccacgccg gtggccagtt ctgaggctag caccctttca acaactcctg 10500
 ttgacaccag cacacctgtg accacttctt ctccaaccaa ttcactcctt acaactgctg 10560
 aagttaccag catgccaaca tcaactgctg gtgaaggaag cactccatta acaaatatgc 10620
 ctgtcagcac cacaccggtg gccagttctg aggctagcac cttttcaaca actcctggtg 10680
 actccaacac ttttgttacc agttctagtc aagccagttc atctccagca actcttcagg 10740
 tcaccactat gcgtatgtct actccaagtg aaggaagctc ttcattaaca actatgctcc 10800
 tcagcagcac atatgtgacc agttctgagg ctagcacacc ttccactcct tctgttgaca 10860
 gaagcacacc tgtgaccact tctactcaga gcaattctac tcttacacct cctgaagtta 10920
 tcaccctgcc aatgtcaact cctagtgaag taagcactcc attaaccatt atgcctgtca 10980
 gcaccacatc ggtgaccatt tctgaggctg gcacagcttc aacacttcct gttgacacca 11040
 gcacacctgt gatcacttct acccaagtca gttcatctcc tgtgactcct gaaggtacca 11100
 ccatgccaat ctggacgcct agtgaaggaa gcactccatt aacaactatg cctgtcagca 11160
 ccacacgtgt gaccagctct gagggtagca ccctttcaac accttctggt gtcaccagca 11220
 cacctgtgac cacttctact gaagccattt catcttctgc aactcttgac agcaccacca 11280
 tgtctgtgtc aatgcccatg gaaataagca cccttgggac cactattctt gtcagtacca 11340
 cacctgttac gaggtttcct gagagtagca ccccttccat accatctggt tacaccagca 11400
 tgtctatgac cactgcctct gaaggcagtt catctectac aactcttgaa ggcaccacca 11460
 ccatgcctat gtcaactacg agtgaagaa gcactttatt gacaactgtc ctcatcagcc 11520

ctatatctgt gatgagtctt tctgaggcca gcacactttc aacacctctt ggtgatacca 11580
 gcacaccttt gctcacctct accaaagccg gttcattctc catacctgct gaagtcacta 11640
 ccatacgtat ttcaattacc agtgaaagaa gcactccatt aacaactctc cttgtcagca 11700
 ccacacttcc aactagcttt cctggggcca gcatagcttc gacacctctt cttgacacaa 11760
 gcacaacttt taccctttct actgacactg cctcaactcc cacaattcct gtagccacca 11820
 ccatatctgt atcagtgatc acagaaggaa gcacacctgg gacaaccatt tttattccca 11880
 gcactcctgt caccagtctt actgctgatg tctttcctgc aacaactggg gctgtatcta 11940
 cccctgtgat aacttccact gaactaaaca caccatcaac ctccagtagt agtaccacca 12000
 catctttttc aactactaag gaatttaca caccgcaat gactactgca gctccctca 12060
 catatgtgac catgtctact gccccagca caccagaac aaccagcaga ggctgcaacta 12120
 cttctgcatc aacgctttct gcaaccagta cacctcacac ctctacttct gtcaccacc 12180
 gtctctgtgac cccttcatca gaatccagca ggccgtcaac aattacttct cacaccatcc 12240
 cacctacatt tcctcctgct cactccagta cacctcaac aacctctgcc tcctccacga 12300
 ctgtgaacc tgaggctgtc accacatga ccaccaggac aaaacccagc acacggacca 12360
 cttccttccc cacgggtgacc accaccgctg tccccagaa tactacaatt aagagcaacc 12420
 ccacctcaac tcctactgtg ccaagaacca caacatgctt tggagatggg tgccagaata 12480
 cggcctctcg ctgcaagaat ggaggcacct gggatgggct caagtgccag tgcaccaacc 12540
 tctattatgg ggagtgtgt gaggaggtgg tcagcagcat tgacataggg ccaccggaga 12600
 ctatctctgc ccaatggaa ctgactgtga cagtgaccag tgtgaagttc accgaagagc 12660
 taaaaacca ctcttcccag gaattccagg agttcaaca gacattcacg gaacagatga 12720
 atattgtgta ttccgggatc cctgagatag tcggggtgaa catcacaag ctacgtcttg 12780
 gcagtgtggt ggtggagcat gacgtcctcc taagaaccaa gtacacacca gaatacaaga 12840
 cagtattgga caatgccacc gaagtagtga aagagaaaat cacaaaagt accacacagc 12900
 aaataatgat taatgatatt tgctcagaca tgatgtgtt caacaccact ggcaccaag 12960
 tgcaaaacat tacgggtgacc cagtacgacc ctgaagagga ctgccggaag atggccaagg 13020
 aatatggaga ctacttcgta gtggagtacc gggaccagaa gccatactgc atcagcccct 13080
 gtgagcctgg cttcagtgtc tccaagaact gtaacctcgg caagtgccag atgtctctaa 13140
 gtggacctca gtgcctctgc gtgaccacgg aaactcactg gtacagtggg gagacctgta 13200
 accagggcac ccagaagagt ctggtgtacg gcctcgtggg ggcaggggtc gtgctgatgc 13260
 tgatcatcct ggtagctctc ctgatgctcg ttttccgctc caagagagag gtgaaacggc 13320
 aaaagtacag attgtctcag ttatacaagt ggcaagaaga ggacagtgga ccagctcctg 13380
 ggaccttcca aaacattggc tttgacatct gccaaagtga tgattccatc cacctggagt 13440
 ccatttatag taatttccag ccctccttga gacacataga ccctgaaaca aagatccgaa 13500
 ttcagaggcc tcaggtaatg acgacatcat ttaaggcat ggagctgaga agtctgggag 13560
 tgaggagatc ccagtccggc taagcttggg ggagcatttt cccattgaga gccttccatg 13620

ES 2 581 841 T3

ggaactcaat gttcccattg taagtacagg aaacaagccc tgtacttacc aaggagaaag 13680
 aggagagaca gcagtgtcgg gagattctca aatagaaacc cgtggacgct ccaatgggct 13740
 tgtcatgata tcaggctagg ctttctgct ctttttcaa agacgctcca gatttgaggg 13800
 tactctgact gcaacatctt tcaccccatt gatcgccagg attgatttgg ttgatctggc 13860
 tgagcaggcg ggtgtccccg tcctccctca ctgcccata tgtgtccctc ctaaagctgc 13920
 atgctcagtt gaagaggacg agaggacgac cttctctgat agaggaggac cacgcttcag 13980
 tcaaaggcat acaagtatct atctggactt ccctgctagc acttccaaac aagctcagag 14040
 atgttctccc cctcatctgc ccgggttcag taccatggac agcgccctcg acccgctggt 14100
 tacaaccatg accccttggg cactggactg catgcacttt acatatcaca aaatgctctc 14160
 ataagaatta ttgcatacca tcttcatgaa aaacacctgt atttaaata agagcattta 14220
 ccttttgga tataagattg tgggtatttt ttaagttctt attggtatga gttctgattt 14280
 tttccttagt aaatattata atatatattt gtagtaacta aaaataataa agcaatttta 14340
 ttacaatttt aaaaaaaaaa 14360

<210> 3
 <211> 632
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<400> 3

cccagaatgt tgacagtcgc tctcctagcc cttctctgtg cctcagcctc tggcaatgcc 60
 attcaggcca ggtcttcctc ctatagtggg gagtatggaa gtgggtgtgg aaagcgattc 120
 tctcattctg gcaaccagtt ggacggcccc atcaccgccc tccgggtccg agtcaacaca 180
 tactacatcg taggtcttca ggtgcgctat ggcaagggtg ggagcgacta tgtgggtggt 240
 cgcaacggag acctggagga gatctttctg caccctgggg aatcagtgat ccaggtttct 300
 gggaaagtaca agtggtagct gaagaagctg gtatttgtga cagacaaggg ccgctatctg 360
 tcttttggga aagacagtgg cacaagtttc aatgcccgtc cttgacccc caacaccgtg 420
 ctccgcttca tcagtggccg gtctggttct ctcacgatg ccattggcct gactgggat 480
 gtttacccca ctagctgcag cagatgctga gcctcctctc cttggcaggg gactgtgat 540
 gaggagtaag aactccctta tactaacc ccatccaaat ggctcaataa aaaaatatgg 600
 ttaaggctaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 632

10

<210> 4
 <211> 6207
 <212> PRT
 <213> Humano

15

<400> 4

Met Ser Val Gly Arg Arg Lys Leu Ala Leu Leu Trp Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Cys Thr Arg His Thr Gly His Ala Gln Asp Gly Ser Ser

20

ES 2 581 841 T3

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

ES 2 581 841 T3

Ser Cys Val Cys His Thr Leu Ala Glu Tyr Ser Arg Gln Cys Thr His
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Leu Pro Gln Asp Trp Arg Gly Pro Asp Phe Cys Pro Gln
 325 330 335
 Lys Cys Pro Asn Asn Met Gln Tyr His Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ala
 340 345 350
 Asp Thr Cys Ser Asn Gln Glu His Ser Arg Ala Cys Glu Asp His Cys
 355 360 365
 Val Ala Gly Cys Phe Cys Pro Glu Gly Thr Val Leu Asp Asp Ile Gly
 370 375 380
 Gln Thr Gly Cys Val Pro Val Ser Lys Cys Ala Cys Val Tyr Asn Gly
 385 390 395 400
 Ala Ala Tyr Ala Pro Gly Ala Thr Tyr Ser Thr Asp Cys Thr Asn Cys
 405 410 415
 Thr Cys Ser Gly Gly Arg Trp Ser Cys Gln Glu Val Pro Cys Pro Gly
 420 425 430
 Thr Cys Ser Val Leu Gly Gly Ala His Phe Ser Thr Phe Asp Gly Lys
 435 440 445
 Gln Tyr Thr Val His Gly Asp Cys Ser Tyr Val Leu Thr Lys Pro Cys
 450 455 460
 Asp Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Ala Glu Leu Arg Arg Cys Gly Leu
 465 470 475 480
 Thr Asp Ser Glu Thr Cys Leu Lys Ser Val Thr Leu Ser Leu Asp Gly
 485 490 495
 Ala Gln Thr Val Val Val Ile Lys Ala Ser Gly Glu Val Phe Leu Asn
 500 505 510
 Gln-Ile Tyr Thr Gln Leu Pro Ile Ser Ala Ala Asn Val Thr Ile Phe
 515 520 525
 Arg Pro Ser Thr Phe Phe Ile Ile Ala Gln Thr Ser Leu Gly Leu Gln
 530 535 540
 Leu Asn Leu Gln Leu Val Pro Thr Met Gln Leu Phe Met Gln Leu Ala
 545 550 555 560
 Pro Lys Leu Arg Gly Gln Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ser
 565 570 575

ES 2 581 841 T3

Ile Gln Ala Asp Asp Phe Arg Thr Leu Ser Gly Val Val Glu Ala Thr
 580 585 590

Ala Ala Ala Phe Phe Asn Thr Phe Lys Thr Gln Ala Ala Cys Pro Asn
 595 600 605

Ile Arg Asn Ser Phe Glu Asp Pro Cys Ser Leu Ser Val Glu Asn Ala
 610 615 620

Pro Arg Met Gly Ala Pro Ser Ala Cys Arg Thr Leu Val Leu Ala Leu
 625 630 635 640

Ala Ala Met Leu Val Val Pro Gln Ala Glu Thr Gln Gly Pro Val Glu
 645 650 655

Pro Ser Trp Glu Asn Ala Gly His Thr Met Asp Gly Gly Ala Pro Thr
 660 665 670

Ser Ser Pro Thr Arg Arg Val Ser Phe Val Pro Pro Val Thr Val Phe
 675 680 685

Pro Ser Leu Ser Arg Lys Gln Met Leu Pro Leu Pro Ala Gly Lys Gly
 690 695 700

Val Phe Ala Ser Pro Lys Gly Gly Gly Pro Asp Leu Gly Val Gln Leu
 705 710 715 720

Pro Pro Ala Leu Asn Pro Ala His Asn Gly Arg Val Cys Ser Thr Trp
 725 730 735

Gly Asp Phe His Tyr Lys Thr Phe Asp Gly Asp Val Phe Arg Phe Pro
 740 745 750

Gly Leu Cys Asn Tyr Val Phe Ser Glu His Cys Arg Ala Ala Tyr Glu
 755 760 765

Asp Phe Asn Val Gln Leu Arg Arg Gly Leu Val Gly Ser Arg Pro Val
 770 775 780

Val Thr Arg Val Val Ile Lys Ala Gln Gly Leu Val Leu Glu Ala Ser
 785 790 795 800

Asn Gly Ser Val Leu Ile Asn Gly Gln Arg Glu Glu Leu Pro Tyr Ser
 805 810 815

Arg Thr Gly Leu Leu Val Glu Gln Ser Gly Asp Tyr Ile Lys Val Ser
 820 825 830

Ile Arg Leu Val Leu Thr Phe Leu Trp Asn Gly Glu Asp Ser Ala Leu
 835 840 845

ES 2 581 841 T3

Leu Glu Leu Asp Pro Lys Tyr Ala Asn Gln Thr Cys Gly Leu Cys Gly
 850 855 860
 Asp Phe Asn Gly Leu Pro Ala Phe Asn Glu Phe Tyr Ala His Asn Ala
 865 870 875 880
 Arg Leu Thr Pro Leu Gln Phe Gly Asn Leu Gln Lys Leu Asp Gly Pro
 885 890 895
 Thr Glu Gln Cys Pro Asp Pro Leu Pro Leu Pro Ala Gly Asn Cys Thr
 900 905 910
 Asp Glu Glu Gly Ile Cys His Arg Thr Leu Leu Gly Pro Ala Phe Ala
 915 920 925
 Glu Cys His Ala Leu Val Asp Ser Thr Ala Tyr Leu Ala Ala Cys Ala
 930 935 940
 Gln Asp Leu Cys Arg Cys Pro Thr Cys Pro Cys Ala Thr Phe Val Glu
 945 950 955 960
 Tyr Ser Arg Gln Cys Ala His Ala Gly Gly Gln Pro Arg Asn Trp Arg
 965 970 975
 Cys Pro Glu Leu Cys Pro Arg Thr Cys Pro Leu Asn Met Gln His Gln
 980 985 990
 Glu Cys Gly Ser Pro Cys Thr Asp Thr Cys Ser Asn Pro Gln Arg Ala
 995 1000 1005
 Gln Leu Cys Glu Asp His Cys Val Asp Gly Cys Phe Cys Pro Pro
 1010 1015 1020
 Gly Arg Ser Cys Thr Val Leu Asp Asp Ile Thr His Ser Gly Cys
 1025 1030 1035
 Leu Pro Leu Gly Gln Cys Pro Cys Thr His Gly Gly Arg Thr Tyr
 1040 1045 1050
 Ser Pro Gly Thr Ser Phe Asn Thr Thr Cys Ser Ser Cys Thr Cys
 1055 1060 1065
 Ser Gly Gly Leu Trp Gln Cys Gln Asp Leu Pro Cys Pro Gly Thr
 1070 1075 1080
 Cys Ser Val Gln Gly Gly Ala His Ile Ser Thr Tyr Asp Glu Lys
 1085 1090 1095
 Leu Tyr Asp Leu His Gly Asp Cys Ser Tyr Val Leu Ser Lys Lys
 1100 1105 1110
 Cys Ala Asp Ser Ser Phe Thr Val Leu Ala Glu Leu Arg Lys Cys

ES 2 581 841 T3

1115				1120				1125						
Gly	Leu	Thr	Asp	Asn	Glu	Asn	Cys	Leu	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Ser
1130				1135		1135					1140			
Leu	Asp	Gly	Gly	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Gln	Ala	Asp	Gly	Gly
1145						1150					1155			
Val	Phe	Leu	Asn	Ser	Ile	Tyr	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Ala
1160						1165					1170			
Asn	Ile	Thr	Leu	Phe	Thr	Pro	Ser	Ser	Phe	Phe	Ile	Val	Val	Gln
1175						1180					1185			
Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu	Val	Gln	Leu	Val	Pro	Leu	Met
1190						1195					1200			
Gln	Val	Phe	Val	Arg	Leu	Asp	Pro	Ala	His	Gln	Gly	Gln	Met	Cys
1205						1210					1215			
Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asn	Gln	Asn	Gln	Ala	Asp	Asp	Phe	Thr
1220						1225					1230			
Ala	Leu	Ser	Gly	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Phe	Ala	Asn
1235						1240					1245			
Thr	Trp	Lys	Ala	Gln	Ala	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Arg	Asn	Ser	Phe
1250						1255					1260			
Glu	Asp	Pro	Cys	Ser	Leu	Ser	Val	Glu	Asn	Glu	Asn	Tyr	Ala	Arg
1265						1270					1275			
His	Trp	Cys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asp	Pro	Asn	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg
1280						1285					1290			
Cys	His	Ser	Ile	Ile	Asn	Pro	Lys	Pro	Phe	His	Ser	Asn	Cys	Met
1295						1300					1305			
Phe	Asp	Thr	Cys	Asn	Cys	Glu	Arg	Ser	Glu	Asp	Cys	Leu	Cys	Ala
1310						1315					1320			
Ala	Leu	Ser	Ser	Tyr	Val	His	Ala	Cys	Ala	Ala	Lys	Gly	Val	Gln
1325						1330					1335			
Leu	Ser	Asp	Trp	Arg	Asp	Gly	Val	Cys	Thr	Lys	Tyr	Met	Gln	Asn
1340						1345					1350			
Cys	Pro	Lys	Ser	Gln	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Val	Val	Asp	Ala	Cys	Gln
1355						1360					1365			
Pro	Thr	Cys	Arg	Gly	Leu	Ser	Glu	Ala	Asp	Val	Thr	Cys	Ser	Val
1370						1375					1380			

ES 2 581 841 T3

Ser Phe Val Pro Val Asp Gly Cys Thr Cys Pro Ala Gly Thr Phe
 1385 1390 1395

Leu Asn Asp Ala Gly Ala Cys Val Pro Ala Gln Glu Cys Pro Cys
 1400 1405 1410

Tyr Ala His Gly Thr Val Leu Ala Pro Gly Glu Val Val His Asp
 1415 1420 1425

Glu Gly Ala Val Cys Ser Cys Thr Gly Gly Lys Leu Ser Cys Leu
 1430 1435 1440

Gly Ala Ser Leu Gln Lys Ser Thr Gly Cys Ala Ala Pro Met Val
 1445 1450 1455

Tyr Leu Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ala Gly Thr Pro Gly Ala Glu
 1460 1465 1470

Cys Leu Arg Ser Cys His Thr Leu Asp Val Gly Cys Phe Ser Thr
 1475 1480 1485

His Cys Val Ser Gly Cys Val Cys Pro Pro Gly Leu Val Ser Asp
 1490 1495 1500

Gly Ser Gly Gly Cys Ile Ala Glu Glu Asp Cys Pro Cys Val His
 1505 1510 1515

Asn Glu Ala Thr Tyr Lys Pro Gly Glu Thr Ile Arg Val Asp Cys
 1520 1525 1530

Asn Thr Cys Thr Cys Arg Asn Arg Arg Trp Glu Cys Ser His Arg
 1535 1540 1545

Leu Cys Leu Gly Thr Cys Val Ala Tyr Gly Asp Gly His Phe Ile
 1550 1555 1560

Thr Phe Asp Gly Asp Arg Tyr Ser Phe Glu Gly Ser Cys Glu Tyr
 1565 1570 1575

Ile Leu Ala Gln Asp Tyr Cys Gly Asp Asn Thr Thr His Gly Thr
 1580 1585 1590

Phe Arg Ile Val Thr Glu Asn Ile Pro Cys Gly Thr Thr Gly Thr
 1595 1600 1605

Thr Cys Ser Lys Ala Ile Lys Leu Phe Val Glu Val Arg Thr Ala
 1610 1615 1620

Pro Ala Val Ser Thr Pro Asp Pro Ala Ala Asn Glu Pro Ala Pro
 1625 1630 1635

ES 2 581 841 T3

Arg Glu Ala Ser Val Gly Phe Arg Gln Arg Leu Pro Pro Leu Gln
 1640 1645 1650
 Ser Tyr Glu Leu Ile Leu Gln Glu Gly Thr Phe Lys Ala Val Ala
 1655 1660 1665
 Arg Gly Pro Gly Gly Asp Pro Pro Tyr Lys Ile Arg Tyr Met Gly
 1670 1675 1680
 Ile Phe Leu Val Ile Glu Thr His Gly Met Ala Val Ser Trp Asp
 1685 1690 1695
 Arg Lys Thr Ser Val Phe Ile Arg Leu His Gln Asp Tyr Lys Gly
 1700 1705 1710
 Arg Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Asp Asn Ala Ile Asn
 1715 1720 1725
 Asp Phe Ala Thr Arg Ser Arg Ser Val Val Gly Asp Ala Leu Glu
 1730 1735 1740
 Phe Gly Asn Ser Trp Lys Leu Ser Pro Ser Cys Pro Asp Ala Leu
 1745 1750 1755
 Ala Pro Lys Asp Pro Cys Thr Ala Asn Pro Phe Arg Lys Ser Trp
 1760 1765 1770
 Ala Gln Lys Gln Cys Ser Ile Leu His Gly Pro Thr Phe Ala Ala
 1775 1780 1785
 Cys Arg Ser Gln Val Asp Ser Thr Lys Tyr Tyr Glu Ala Cys Val
 1790 1795 1800
 Asn Asp Ala Cys Ala Cys Asp Ser Gly Gly Asp Cys Glu Cys Phe
 1805 1810 1815
 Cys Thr Ala Val Ala Ala Tyr Ala Gln Ala Cys His Asp Ala Gly
 1820 1825 1830
 Leu Cys Val Ser Trp Arg Thr Pro Asp Thr Cys Pro Leu Phe Cys
 1835 1840 1845
 Asp Phe Tyr Asn Pro His Gly Gly Cys Glu Trp His Tyr Gln Pro
 1850 1855 1860
 Cys Gly Ala Pro Cys Leu Lys Thr Cys Arg Asn Pro Ser Gly His
 1865 1870 1875
 Cys Leu Val Asp Leu Pro Gly Leu Glu Gly Cys Tyr Pro Lys Cys
 1880 1885 1890

ES 2 581 841 T3

Pro Pro Ser Gln Pro Phe Phe Asn Glu Asp Gln Met Lys Cys Val
 1895 1900 1905
 Ala Gln Cys Gly Cys Tyr Asp Lys Asp Gly Asn Tyr Tyr Asp Val
 1910 1915 1920
 Gly Ala Arg Val Pro Thr Ala Glu Asn Cys Gln Ser Cys Asn Cys
 1925 1930 1935
 Thr Pro Ser Gly Ile Gln Cys Ala His Ser Leu Glu Ala Cys Thr
 1940 1945 1950
 Cys Thr Tyr Glu Asp Arg Thr Tyr Ser Tyr Gln Asp Val Ile Tyr
 1955 1960 1965
 Asn Thr Thr Asp Gly Leu Gly Ala Cys Leu Ile Ala Ile Cys Gly
 1970 1975 1980
 Ser Asn Gly Thr Ile Ile Arg Lys Ala Val Ala Cys Pro Gly Thr
 1985 1990 1995
 Pro Ala Thr Thr Pro Phe Thr Phe Thr Thr Ala Trp Val Pro His
 2000 2005 2010
 Ser Thr Thr Ser Pro Ala Leu Pro Val Ser Thr Val Cys Val Arg
 2015 2020 2025
 Glu Val Cys Arg Trp Ser Ser Trp Tyr Asn Gly His Arg Pro Glu
 2030 2035 2040
 Pro Gly Leu Gly Gly Gly Asp Phe Glu Thr Phe Glu Asn Leu Arg
 2045 2050 2055
 Gln Arg Gly Tyr Gln Val Cys Pro Val Leu Ala Asp Ile Glu Cys
 2060 2065 2070
 Arg Ala Ala Gln Leu Pro Asp Met Pro Leu Glu Glu Leu Gly Gln
 2075 2080 2085
 Gln Val Asp Cys Asp Arg Met Arg Gly Leu Met Cys Ala Asn Ser
 2090 2095 2100
 Gln Gln Ser Pro Pro Leu Cys His Asp Tyr Glu Leu Arg Val Leu
 2105 2110 2115
 Cys Cys Glu Tyr Val Pro Cys Gly Pro Ser Pro Ala Pro Gly Thr
 2120 2125 2130
 Ser Pro Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ser Thr Glu Pro Ala Val Pro
 2135 2140 2145
 Thr Pro Thr Gln Thr Thr Ala Thr Glu Lys Thr Thr Leu Trp Val

ES 2 581 841 T3

2150				2155				2160						
Thr	Pro	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Thr	Ser	Gln	Thr	Gly
	2165					2170					2175			
Ser	Ser	Ser	Gly	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Pro	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr
	2180					2185					2190			
Thr	Thr	Cys	Gln	Pro	Arg	Cys	Gln	Trp	Thr	Glu	Trp	Phe	Asp	Glu
	2195					2200					2205			
Asp	Tyr	Pro	Lys	Ser	Glu	Gln	Leu	Gly	Gly	Asp	Val	Glu	Ser	Tyr
	2210					2215					2220			
Asp	Lys	Ile	Arg	Ala	Ala	Gly	Gly	His	Leu	Cys	Gln	Gln	Pro	Lys
	2225					2230					2235			
Asp	Ile	Glu	Cys	Gln	Ala	Glu	Ser	Phe	Pro	Asn	Trp	Thr	Leu	Ala
	2240					2245					2250			
Gln	Val	Gly	Gln	Lys	Val	His	Cys	Asp	Val	His	Phe	Gly	Leu	Val
	2255					2260					2265			
Cys	Arg	Asn	Trp	Glu	Gln	Glu	Gly	Val	Phe	Lys	Met	Cys	Tyr	Asn
	2270					2275					2280			
Tyr	Arg	Ile	Arg	Val	Leu	Cys	Cys	Ser	Asp	Asp	His	Cys	Arg	Gly
	2285					2290					2295			
Arg	Ala	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Glu	Leu	Glu	Thr	Ala	Thr
	2300					2305					2310			
Thr	Thr	Thr	Thr	Gln	Ala	Leu	Phe	Ser	Thr	Pro	Gln	Pro	Thr	Ser
	2315					2320					2325			
Ser	Pro	Gly	Leu	Thr	Arg	Ala	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Val
	2330					2335					2340			
Pro	Thr	Leu	Ser	Glu	Gly	Leu	Thr	Ser	Pro	Arg	Tyr	Thr	Ser	Thr
	2345					2350					2355			
Leu	Gly	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Gly	Pro	Thr	Thr	Pro	Ala	Gly	Ser
	2360					2365					2370			
Thr	Glu	Pro	Thr	Val	Pro	Gly	Val	Ala	Thr	Ser	Thr	Leu	Pro	Thr
	2375					2380					2385			
Arg	Ser	Ala	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Trp	Arg
	2390					2395					2400			
Pro	Ser	Gln	Pro	Pro	Thr	Leu	Ala	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Thr	Ser
	2405					2410					2415			

ES 2 581 841 T3

Arg Ala Arg Pro Thr Gly Thr Ala Ser Thr Ala Ser Lys Glu Pro
 2420 2425 2430
 Leu Thr Thr Ser Leu Ala Pro Thr Leu Thr Ser Glu Leu Ser Thr
 2435 2440 2445
 Ser Gln Ala Glu Thr Ser Thr Pro Arg Thr Glu Thr Thr Met Ser
 2450 2455 2460
 Pro Leu Thr Asn Thr Thr Thr Ser Gln Gly Thr Thr Arg Cys Gln
 2465 2470 2475
 Pro Lys Cys Glu Trp Thr Glu Trp Phe Asp Val Asp Phe Pro Thr
 2480 2485 2490
 Ser Gly Val Ala Gly Gly Asp Met Glu Thr Phe Glu Asn Ile Arg
 2495 2500 2505
 Ala Ala Gly Gly Lys Met Cys Trp Ala Pro Lys Ser Ile Glu Cys
 2510 2515 2520
 Arg Ala Glu Asn Tyr Pro Glu Val Ser Ile Asp Gln Val Gly Gln
 2525 2530 2535
 Val Leu Thr Cys Ser Leu Glu Thr Gly Leu Thr Cys Lys Asn Glu
 2540 2545 2550
 Asp Gln Thr Gly Arg Phe Asn Met Cys Phe Asn Tyr Asn Val Arg
 2555 2560 2565
 Val Leu Cys Cys Asp Asp Tyr Ser His Cys Pro Ser Thr Pro Ala
 2570 2575 2580
 Thr Ser Ser Thr Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp
 2585 2590 2595
 Ile Leu Thr Lys Pro Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ser Thr
 2600 2605 2610
 Gly Ser Thr Ala Thr Pro Thr Ser Thr Leu Arg Thr Ala Pro Pro
 2615 2620 2625
 Pro Lys Val Leu Thr Thr Thr Ala Thr Thr Pro Thr Val Thr Ser
 2630 2635 2640
 Ser Lys Ala Thr Pro Ser Ser Ser Pro Gly Thr Ala Thr Ala Leu
 2645 2650 2655
 Pro Ala Leu Arg Ser Thr Ala Thr Thr Pro Thr Ala Thr Ser Val
 2660 2665 2670

ES 2 581 841 T3

Thr Pro Ile Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Thr Trp Thr Arg Leu
 2675 2680 2685
 Ser Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ala Thr Met Ser Thr Ala Thr Pro
 2690 2695 2700
 Ser Ser Thr Pro Glu Thr Ala His Thr Ser Thr Val Leu Thr Ala
 2705 2710 2715
 Thr Ala Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ser Val Ala Thr Pro Ser
 2720 2725 2730
 Ser Thr Pro Gly Thr Ala His Thr Thr Lys Val Pro Thr Thr Thr
 2735 2740 2745
 Thr Thr Gly Phe Thr Ala Thr Pro Ser Ser Ser Pro Gly Thr Ala
 2750 2755 2760
 Leu Thr Pro Pro Val Trp Ile Ser Thr Thr Thr Thr Pro Thr Thr
 2765 2770 2775
 Arg Gly Ser Thr Val Thr Pro Ser Ser Ile Pro Gly Thr Thr His
 2780 2785 2790
 Thr Ala Thr Val Leu Thr Thr Thr Thr Thr Val Ala Thr Gly
 2795 2800 2805
 Ser Met Ala Thr Pro Ser Ser Ser Thr Gln Thr Ser Gly Thr Thr
 2810 2815 2820
 His Thr Pro Pro Val Pro Asn Thr Met Ala Thr Thr His Gly Arg
 2825 2830 2835
 Ser Leu Pro Pro Ser Ser Pro His Thr Val Arg Thr Ala Trp Thr
 2840 2845 2850
 Ser Ala Thr Ser Gly Ile Leu Gly Thr Thr His Ile Thr Glu Pro
 2855 2860 2865
 Ser Thr Val Thr Ser His Thr Leu Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr
 2870 2875 2880
 Gln His Ser Thr Pro Ala Leu Ser Ser Pro His Pro Ser Ser Arg
 2885 2890 2895
 Thr Thr Glu Ser Pro Pro Ser Pro Gly Thr Thr Thr Pro Gly His
 2900 2905 2910
 Thr Thr Ala Thr Ser Arg Thr Thr Ala Thr Ala Thr Pro Ser Lys
 2915 2920 2925

ES 2 581 841 T3

Thr Arg Thr Ser Thr Leu Leu Pro Ser Ser Pro Thr Ser Ala Pro
 2930 2935 2940
 Ile Thr Thr Val Val Thr Met Gly Cys Glu Pro Gln Cys Ala Trp
 2945 2950 2955
 Ser Glu Trp Leu Asp Tyr Ser Tyr Pro Met Pro Gly Pro Ser Gly
 2960 2965 2970
 Gly Asp Phe Asp Thr Tyr Ser Asn Ile Arg Ala Ala Gly Gly Ala
 2975 2980 2985
 Val Cys Glu Gln Pro Leu Gly Leu Glu Cys Arg Ala Gln Ala Gln
 2990 2995 3000
 Pro Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Gly Gln Val Val Glu Cys Ser
 3005 3010 3015
 Leu Asp Phe Gly Leu Val Cys Arg Asn Arg Glu Gln Val Gly Lys
 3020 3025 3030
 Phe Lys Met Cys Phe Asn Tyr Glu Ile Arg Val Phe Cys Cys Asn
 3035 3040 3045
 Tyr Gly His Cys Pro Ser Thr Pro Ala Thr Ser Ser Thr Ala Met
 3050 3055 3060
 Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp Ile Leu Thr Glu Leu Thr
 3065 3070 3075
 Thr Thr Ala Thr Thr Thr Glu Ser Thr Gly Ser Thr Ala Thr Pro
 3080 3085 3090
 Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp Ile Leu Thr Glu Pro Ser Thr
 3095 3100 3105
 Thr Ala Thr Val Thr Val Pro Thr Gly Ser Thr Ala Thr Ala Ser
 3110 3115 3120
 Ser Thr Gln Ala Thr Ala Gly Thr Pro His Val Ser Thr Thr Ala
 3125 3130 3135
 Thr Thr Pro Thr Val Thr Ser Ser Lys Ala Thr Pro Phe Ser Ser
 3140 3145 3150
 Pro Gly Thr Ala Thr Ala Leu Pro Ala Leu Arg Ser Thr Ala Thr
 3155 3160 3165
 Thr Pro Thr Ala Thr Ser Phe Thr Ala Ile Pro Ser Ser Ser Leu
 3170 3175 3180
 Gly Thr Thr Trp Thr Arg Leu Ser Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ala

ES 2 581 841 T3

3185 3190 3195
 Thr Met Ser Thr Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Glu Thr Val His
 3200 3205 3210
 Thr Ser Thr Val Leu Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Gly Ala Thr
 3215 3220 3225
 Gly Ser Val Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Ala His Thr
 3230 3235 3240
 Thr Lys Val Leu Thr Thr Thr Thr Thr Gly Phe Thr Ala Thr Pro
 3245 3250 3255
 Ser Ser Ser Pro Gly Thr Ala Arg Thr Leu Pro Val Trp Ile Ser
 3260 3265 3270
 Thr Thr Thr Thr Pro Thr Thr Arg Gly Ser Thr Val Thr Pro Ser
 3275 3280 3285
 Ser Ile Pro Gly Thr Thr His Thr Pro Thr Val Leu Thr Thr Thr
 3290 3295 3300
 Thr Thr Thr Val Ala Thr Gly Ser Met Ala Thr Pro Ser Ser Ser
 3305 3310 3315
 Thr Gln Thr Ser Gly Thr Thr His Thr Pro Pro Val Pro Asn Thr
 3320 3325 3330
 Thr Ala Thr Thr His Gly Arg Ser Leu Ser Pro Ser Ser Pro His
 3335 3340 3345
 Thr Val Arg Thr Ala Trp Thr Ser Ala Thr Ser Gly Thr Leu Gly
 3350 3355 3360
 Thr Thr His Ile Thr Glu Pro Ser Thr Gly Thr Ser His Thr Pro
 3365 3370 3375
 Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gln His Ser Thr Pro Ala Leu Ser
 3380 3385 3390
 Ser Pro His Pro Ser Ser Arg Thr Thr Glu Ser Pro Pro Ser Pro
 3395 3400 3405
 Gly Thr Thr Thr Pro Gly His Thr Arg Ala Thr Ser Arg Thr Thr
 3410 3415 3420
 Ala Thr Ala Thr Pro Ser Lys Thr Arg Thr Ser Thr Leu Leu Pro
 3425 3430 3435
 Ser Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ile Thr Thr Val Val Thr Met Gly
 3440 3445 3450

ES 2 581 841 T3

Cys Glu Pro Gln Cys Ala Trp Ser Glu Trp Leu Asp Tyr Ser Tyr
 3455 3460 3465
 Pro Met Pro Gly Pro Ser Gly Gly Asp Phe Asp Thr Tyr Ser Asn
 3470 3475 3480
 Ile Arg Ala Ala Gly Gly Ala Val Cys Glu Gln Pro Leu Gly Leu
 3485 3490 3495
 Glu Cys Arg Ala Gln Ala Gln Pro Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu
 3500 3505 3510
 Gly Gln Val Val Glu Cys Ser Leu Asp Phe Gly Leu Val Cys Arg
 3515 3520 3525
 Asn Arg Glu Gln Val Gly Lys Phe Lys Met Cys Phe Asn Tyr Glu
 3530 3535 3540
 Ile Arg Val Phe Cys Cys Asn Tyr Gly His Cys Pro Ser Thr Pro
 3545 3550 3555
 Ala Thr Ser Ser Thr Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr
 3560 3565 3570
 Trp Ile Leu Thr Glu Gln Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Thr
 3575 3580 3585
 Thr Gly Ser Thr Ala Ile Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Ala Pro
 3590 3595 3600
 Pro Pro Lys Val Leu Thr Ser Thr Ala Thr Thr Pro Thr Ala Thr
 3605 3610 3615
 Ser Ser Lys Ala Thr Ser Ser Ser Ser Pro Arg Thr Ala Thr Thr
 3620 3625 3630
 Leu Pro Val Leu Thr Ser Thr Ala Thr Lys Ser Thr Ala Thr Ser
 3635 3640 3645
 Phe Thr Pro Ile Pro Ser Phe Thr Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu
 3650 3655 3660
 Pro Glu Gln Thr Thr Thr Pro Met Ala Thr Met Ser Thr Ile His
 3665 3670 3675
 Pro Ser Ser Thr Pro Glu Thr Thr His Thr Ser Thr Val Leu Thr
 3680 3685 3690
 Thr Lys Ala Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ser Ser Met Ser Thr Pro
 3695 3700 3705

ES 2 581 841 T3

Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp Ile Leu Thr Glu Leu Thr Thr
 3710 3715 3720
 Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Pro Thr Ala Thr Pro Ser
 3725 3730 3735
 Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp Ile Leu Thr Glu Pro Ser Thr Thr
 3740 3745 3750
 Ala Thr Val Thr Val Pro Thr Gly Ser Thr Ala Thr Ala Ser Ser
 3755 3760 3765
 Thr Arg Ala Thr Ala Gly Thr Leu Lys Val Leu Thr Ser Thr Ala
 3770 3775 3780
 Thr Thr Pro Thr Val Ile Ser Ser Arg Ala Thr Pro Ser Ser Ser
 3785 3790 3795
 Pro Gly Thr Ala Thr Ala Leu Pro Ala Leu Arg Ser Thr Ala Thr
 3800 3805 3810
 Thr Pro Thr Ala Thr Ser Val Thr Ala Ile Pro Ser Ser Ser Leu
 3815 3820 3825
 Gly Thr Ala Trp Thr Arg Leu Ser Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ala
 3830 3835 3840
 Thr Met Ser Thr Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Glu Thr Val His
 3845 3850 3855
 Thr Ser Thr Val Leu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr
 3860 3865 3870
 Gly Ser Val Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Ala His Thr
 3875 3880 3885
 Thr Lys Val Pro Thr Thr Thr Thr Thr Gly Phe Thr Ala Thr Pro
 3890 3895 3900
 Ser Ser Ser Pro Gly Thr Ala Leu Thr Pro Pro Val Trp Ile Ser
 3905 3910 3915
 Thr Thr Thr Thr Pro Thr Thr Arg Gly Ser Thr Val Thr Pro Ser
 3920 3925 3930
 Ser Ile Pro Gly Thr Thr His Thr Ala Thr Val Leu Thr Thr Thr
 3935 3940 3945
 Thr Thr Thr Val Ala Thr Gly Ser Met Ala Thr Pro Ser Ser Ser
 3950 3955 3960

ES 2 581 841 T3

Thr Gln Thr Ser Gly Thr Thr His Thr Pro Pro Val Pro Asn Thr
 3965 3970 3975
 Thr Ala Thr Thr His Gly Arg Ser Leu Pro Pro Ser Ser Pro His
 3980 3985 3990
 Thr Val Arg Thr Ala Trp Thr Ser Ala Thr Ser Gly Ile Leu Gly
 3995 4000 4005
 Thr Thr His Ile Thr Glu Pro Ser Thr Val Thr Ser His Thr Pro
 4010 4015 4020
 Ala Ala Thr Thr Ser Thr Thr Gln His Ser Thr Pro Ala Leu Ser
 4025 4030 4035
 Ser Pro His Pro Ser Ser Arg Thr Thr Glu Ser Pro Pro Ser Pro
 4040 4045 4050
 Gly Thr Thr Thr Pro Gly His Thr Arg Gly Thr Ser Arg Thr Thr
 4055 4060 4065
 Ala Thr Ala Thr Pro Ser Lys Thr Arg Thr Ser Thr Leu Leu Pro
 4070 4075 4080
 Ser Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ile Thr Thr Val Val Thr Thr Gly
 4085 4090 4095
 Cys Glu Pro Gln Cys Ala Trp Ser Glu Trp Leu Asp Tyr Ser Tyr
 4100 4105 4110
 Pro Met Pro Gly Pro Ser Gly Gly Asp Phe Asp Thr Tyr Ser Asn
 4115 4120 4125
 Ile Arg Ala Ala Gly Gly Ala Val Cys Glu Gln Pro Leu Gly Leu
 4130 4135 4140
 Glu Cys Arg Ala Gln Ala Gln Pro Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu
 4145 4150 4155
 Gly Gln Val Val Glu Cys Ser Leu Asp Phe Gly Leu Val Cys Arg
 4160 4165 4170
 Asn Arg Glu Gln Val Gly Lys Phe Lys Met Cys Phe Asn Tyr Glu
 4175 4180 4185
 Ile Arg Val Phe Cys Cys Asn Tyr Gly His Cys Pro Ser Thr Pro
 4190 4195 4200
 Ala Thr Ser Ser Thr Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr
 4205 4210 4215
 Trp Ile Leu Thr Lys Leu Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Glu Ser

ES 2 581 841 T3

4220		4225		4230
Thr Gly	Ser Thr Ala Thr	Pro	Ser Ser Thr Pro	Gly Thr Thr Trp
4235		4240		4245
Ile Leu	Thr Glu Pro Ser	Thr	Thr Ala Thr Val	Thr Val Pro Thr
4250		4255		4260
Gly Ser	Thr Ala Thr Ala	Ser	Ser Thr Gln Ala	Thr Ala Gly Thr
4265		4270		4275
Pro His	Val Ser Thr Thr	Ala	Thr Thr Pro Thr	Val Thr Ser Ser
4280		4285		4290
Lys Ala	Thr Pro Phe Ser	Ser	Pro Gly Thr Ala	Thr Ala Leu Pro
4295		4300		4305
Ala Leu	Arg Ser Thr Ala	Thr	Thr Pro Thr Ala	Thr Ser Phe Thr
4310		4315		4320
Ala Ile	Pro Ser Ser Ser	Leu	Gly Thr Thr Trp	Thr Arg Leu Ser
4325		4330		4335
Gln Thr	Thr Thr Pro Thr	Ala	Thr Met Ser Thr	Ala Thr Pro Ser
4340		4345		4350
Ser Thr	Pro Glu Thr Ala	His	Thr Ser Thr Val	Leu Thr Thr Thr
4355		4360		4365
Ala Thr	Thr Thr Arg Ala	Thr	Gly Ser Val Ala	Thr Pro Ser Ser
4370		4375		4380
Thr Pro	Gly Thr Ala His	Thr	Thr Lys Val Pro	Thr Thr Thr Thr
4385		4390		4395
Thr Gly	Phe Thr Val Thr	Pro	Ser Ser Ser Pro	Gly Thr Ala Arg
4400		4405		4410
Thr Pro	Pro Val Trp Ile	Ser	Thr Thr Thr Thr	Pro Thr Thr Ser
4415		4420		4425
Gly Ser	Thr Val Thr Pro	Ser	Ser Val Pro Gly	Thr Thr His Thr
4430		4435		4440
Pro Thr	Val Leu Thr Thr	Thr	Thr Thr Thr Val	Ala Thr Gly Ser
4445		4450		4455
Met Ala	Thr Pro Ser Ser	Ser	Thr Gln Thr Ser	Gly Thr Thr His
4460		4465		4470
Thr Pro	Pro Val Pro Asn	Thr	Thr Ala Thr Thr	His Gly Arg Ser
4475		4480		4485

ES 2 581 841 T3

Leu Ser Pro Ser Ser Pro His Thr Val Arg Thr Ala Trp Thr Ser
 4490 4495 4500
 Ala Thr Ser Gly Thr Leu Gly Thr Thr His Ile Thr Glu Pro Ser
 4505 4510 4515
 Thr Gly Thr Ser His Thr Pro Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gln
 4520 4525 4530
 His Ser Thr Pro Ala Leu Ser Ser Pro His Pro Ser Ser Arg Thr
 4535 4540 4545
 Thr Glu Ser Pro Pro Ser Pro Gly Thr Thr Thr Pro Gly His Thr
 4550 4555 4560
 Thr Ala Thr Ser Arg Thr Thr Ala Thr Ala Thr Pro Ser Lys Thr
 4565 4570 4575
 Arg Thr Ser Thr Leu Leu Pro Ser Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ile
 4580 4585 4590
 Thr Thr Val Val Thr Thr Gly Cys Glu Pro Gln Cys Ala Trp Ser
 4595 4600 4605
 Glu Trp Leu Asp Tyr Ser Tyr Pro Met Pro Gly Pro Ser Gly Gly
 4610 4615 4620
 Asp Phe Asp Thr Tyr Ser Asn Ile Arg Ala Ala Gly Gly Ala Val
 4625 4630 4635
 Cys Glu Gln Pro Leu Gly Leu Glu Cys Arg Ala Gln Ala Gln Pro
 4640 4645 4650
 Gly Val Pro Leu Gly Glu Leu Gly Gln Val Val Glu Cys Ser Leu
 4655 4660 4665
 Asp Phe Gly Leu Val Cys Arg Asn Arg Glu Gln Val Gly Lys Phe
 4670 4675 4680
 Lys Met Cys Phe Asn Tyr Glu Ile Arg Val Phe Cys Cys Asn Tyr
 4685 4690 4695
 Gly His Cys Pro Ser Thr Pro Ala Thr Ser Ser Thr Ala Met Pro
 4700 4705 4710
 Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp Ile Leu Thr Glu Leu Thr Thr
 4715 4720 4725
 Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ser Thr Gly Ser Thr Ala Thr Pro Ser
 4730 4735 4740

ES 2 581 841 T3

Ser Thr Pro Gly Thr Ala Pro Pro Pro Lys Val Leu Thr Ser Pro
 4745 4750 4755

Ala Thr Thr Pro Thr Ala Thr Ser Ser Lys Ala Thr Ser Ser Ser
 4760 4765 4770

Ser Pro Arg Thr Ala Thr Thr Leu Pro Val Leu Thr Ser Thr Ala
 4775 4780 4785

Thr Lys Ser Thr Ala Thr Ser Val Thr Pro Ile Pro Ser Ser Thr
 4790 4795 4800

Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Pro Glu Gln Thr Thr Thr Pro Val
 4805 4810 4815

Ala Thr Met Ser Thr Ile His Pro Ser Ser Thr Pro Glu Thr Thr
 4820 4825 4830

His Thr Ser Thr Val Leu Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Arg Ala
 4835 4840 4845

Thr Ser Ser Thr Ser Thr Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp
 4850 4855 4860

Ile Leu Thr Glu Leu Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Thr
 4865 4870 4875

Gly Pro Thr Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp Ile
 4880 4885 4890

Leu Thr Glu Leu Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ser Thr Gly
 4895 4900 4905

Ser Thr Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Trp Ile Leu
 4910 4915 4920

Thr Glu Pro Ser Thr Thr Ala Thr Val Thr Val Pro Thr Gly Ser
 4925 4930 4935

Thr Ala Thr Ala Ser Ser Thr Gln Ala Thr Ala Gly Thr Pro His
 4940 4945 4950

Val Ser Thr Thr Ala Thr Thr Pro Thr Val Thr Ser Ser Lys Ala
 4955 4960 4965

Thr Pro Ser Ser Ser Pro Gly Thr Ala Thr Ala Leu Pro Ala Leu
 4970 4975 4980

Arg Ser Thr Ala Thr Thr Pro Thr Ala Thr Ser Phe Thr Ala Ile
 4985 4990 4995

ES 2 581 841 T3

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Thr Trp Thr Arg Leu Ser Gln Thr
 5000 5005 5010
 Thr Thr Pro Thr Ala Thr Met Ser Thr Ala Thr Pro Ser Ser Thr
 5015 5020 5025
 Pro Glu Thr Val His Thr Ser Thr Val Leu Thr Ala Thr Ala Thr
 5030 5035 5040
 Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ser Val Ala Thr Pro Ser Ser Thr Pro
 5045 5050 5055
 Gly Thr Ala His Thr Thr Lys Val Pro Thr Thr Thr Thr Thr Gly
 5060 5065 5070
 Phe Thr Ala Thr Pro Ser Ser Pro Gly Thr Ala Leu Thr Pro
 5075 5080 5085
 Pro Thr Thr Thr Pro Met Ser Thr Met Ser Thr Ile His Thr Ser
 5090 5095 5100
 Ser Thr Pro Glu Thr Thr His Thr Ser Thr Val Leu Thr Thr Thr
 5105 5110 5115
 Ala Thr Met Thr Arg Ala Thr Asn Ser Thr Ala Thr Pro Ser Ser
 5120 5125 5130
 Thr Leu Gly Thr Thr Arg Ile Leu Thr Glu Leu Thr Thr Thr Ala
 5135 5140 5145
 Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Ser Thr Ala Thr Leu Ser Ser Thr
 5150 5155 5160
 Pro Gly Thr Thr Trp Ile Leu Thr Glu Pro Ser Thr Ile Ala Thr
 5165 5170 5175
 Val Met Val Pro Thr Gly Ser Thr Ala Thr Ala Ser Ser Thr Leu
 5180 5185 5190
 Gly Thr Ala His Thr Pro Lys Val Val Thr Thr Met Ala Thr Met
 5195 5200 5205
 Pro Thr Ala Thr Ala Ser Thr Val Pro Ser Ser Ser Thr Val Gly
 5210 5215 5220
 Thr Thr Arg Thr Pro Ala Val Leu Pro Ser Ser Leu Pro Thr Phe
 5225 5230 5235
 Ser Val Ser Thr Val Ser Ser Ser Val Leu Thr Thr Leu Arg Pro
 5240 5245 5250
 Thr Gly Phe Pro Ser Ser His Phe Ser Thr Pro Cys Phe Cys Arg

ES 2 581 841 T3

5255						5260						5265		
Ala	Phe	Gly	Gln	Phe	Phe	Ser	Pro	Gly	Glu	Val	Ile	Tyr	Asn	Lys
	5270					5275					5280			
Thr	Asp	Arg	Ala	Gly	Cys	His	Phe	Tyr	Ala	Val	Cys	Asn	Gln	His
	5285					5290					5295			
Cys	Asp	Ile	Asp	Arg	Phe	Gln	Gly	Ala	Cys	Pro	Thr	Ser	Pro	Pro
	5300					5305					5310			
Pro	Val	Ser	Ser	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Gly
	5315					5320					5325			
Cys	Asp	Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Arg	Gln	Val	Asn	Glu	Thr	Trp	Thr
	5330					5335					5340			
Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ala	Arg	Cys	Val	Gly	Asp	Asn	Arg	Val
	5345					5350					5355			
Val	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Pro	Val	Ala	Asn	Val	Thr	Cys	Val	Asn
	5360					5365					5370			
Lys	His	Leu	Pro	Ile	Lys	Val	Ser	Asp	Pro	Ser	Gln	Pro	Cys	Asp
	5375					5380					5385			
Phe	His	Tyr	Glu	Cys	Glu	Cys	Glu	Cys	Val	Gly	Gly	Arg	Gly	Ile
	5390					5395					5400			
Thr	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile	Cys	Ser	Met	Trp	Gly	Gly	Ser	His	Tyr
	5405					5410					5415			
Ser	Thr	Phe	Asp	Gly	Thr	Ser	Tyr	Thr	Phe	Arg	Gly	Asn	Cys	Thr
	5420					5425					5430			
Tyr	Val	Leu	Met	Arg	Glu	Ile	His	Ala	Arg	Phe	Gly	Asn	Leu	Ser
	5435					5440					5445			
Leu	Tyr	Leu	Asp	Asn	His	Tyr	Cys	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Ala
	5450					5455					5460			
Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Cys	Pro	Arg	Ala	Leu	Ser	Ile	His	Tyr	Lys
	5465					5470					5475			
Ser	Met	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Val	Thr	Met	Val	His	Gly	Lys	Glu
	5480					5485					5490			
Glu	Gly	Leu	Ile	Leu	Phe	Asp	Gln	Ile	Pro	Val	Ser	Ser	Gly	Phe
	5495					5500					5505			
Ser	Lys	Asn	Gly	Val	Leu	Val	Ser	Val	Leu	Gly	Thr	Thr	Thr	Met
	5510					5515					5520			

ES 2 581 841 T3

Arg Val Asp Ile Pro Ala Leu Gly Val Ser Val Thr Phe Asn Gly
 5525 5530 5535

Gln Val Phe Gln Ala Arg Leu Pro Tyr Ser Leu Phe His Asn Asn
 5540 5545 5550

Thr Glu Gly Gln Cys Gly Thr Cys Thr Asn Asn Gln Arg Asp Asp
 5555 5560

Cys Leu Gln Arg Asp Gly Thr Thr Ala Ala Ser Cys Lys Asp Met
 5570 5575 5580

Ala Lys Thr Trp Leu Val Pro Asp Ser Arg Lys Asp Gly Cys Trp
 5585 5590 5595

Ala Pro Thr Gly Thr Pro Pro Thr Ala Ser Pro Ala Ala Pro Val
 5600 5605 5610

Ser Ser Thr Pro Thr Pro Thr Pro Cys Pro Pro Gln Pro Leu Cys
 5615 5620 5625

Asp Leu Met Leu Ser Gln Val Phe Ala Glu Cys His Asn Leu Val
 5630 5635 5640

Pro Pro Gly Pro Phe Phe Asn Ala Cys Ile Ser Asp His Cys Arg
 5645 5650 5655

Gly Arg Leu Glu Val Pro Cys Gln Ser Leu Glu Ala Tyr Ala Glu
 5660 5665 5670

Leu Cys Arg Ala Arg Gly Val Cys Ser Asp Trp Arg Gly Ala Thr
 5675 5680 5685

Gly Gly Leu Cys Asp Leu Thr Cys Pro Pro Thr Lys Val Tyr Lys
 5690 5695 5700

Pro Cys Gly Pro Ile Gln Pro Ala Thr Cys Asn Ser Arg Asn Gln
 5705 5710 5715

Ser Pro Gln Leu Glu Gly Met Ala Glu Gly Cys Phe Cys Pro Glu
 5720 5725 5730

Asp Gln Ile Leu Phe Asn Ala His Met Gly Ile Cys Val Gln Ala
 5735 5740 5745

Cys Pro Cys Val Gly Pro Asp Gly Phe Pro Lys Phe Pro Gly Glu
 5750 5755 5760

Arg Trp Val Ser Asn Cys Gln Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Ser
 5765 5770 5775

ES 2 581 841 T3

Val Ser Val Gln Cys Lys Pro Leu Pro Cys Asp Ala Gln Gly Gln
 5780 5785 5790
 Pro Pro Pro Cys Asn Arg Pro Gly Phe Val Thr Val Thr Arg Pro
 5795 5800 5805
 Arg Ala Glu Asn Pro Cys Cys Pro Glu Thr Val Cys Val Cys Asn
 5810 5815 5820
 Thr Thr Thr Cys Pro Gln Ser Leu Pro Val Cys Pro Pro Gly Gln
 5825 5830 5835
 Glu Ser Ile Cys Thr Gln Glu Glu Gly Asp Cys Cys Pro Thr Phe
 5840 5845 5850
 Arg Cys Arg Pro Gln Leu Cys Ser Tyr Asn Gly Thr Phe Tyr Gly
 5855 5860 5865
 Val Gly Ala Thr Phe Pro Gly Ala Leu Pro Cys His Met Cys Thr
 5870 5875 5880
 Cys Leu Ser Gly Asp Thr Gln Asp Pro Thr Val Gln Cys Gln Glu
 5885 5890 5895
 Asp Ala Cys Asn Asn Thr Thr Cys Pro Gln Gly Phe Glu Tyr Lys
 5900 5905 5910
 Arg Val Ala Gly Gln Cys Cys Gly Glu Cys Val Gln Thr Ala Cys
 5915 5920 5925
 Leu Thr Pro Asp Gly Gln Pro Val Gln Leu Asn Glu Thr Trp Val
 5930 5935 5940
 Asn Ser His Val Asp Asn Cys Thr Val Tyr Leu Cys Glu Ala Glu
 5945 5950 5955
 Gly Gly Val His Leu Leu Thr Pro Gln Pro Ala Ser Cys Pro Asp
 5960 5965 5970
 Val Ser Ser Cys Arg Gly Ser Leu Arg Lys Thr Gly Cys Cys Tyr
 5975 5980 5985
 Ser Cys Glu Glu Asp Ser Cys Gln Val Arg Ile Asn Thr Thr Ile
 5990 5995 6000
 Leu Trp His Gln Gly Cys Glu Thr Glu Val Asn Ile Thr Phe Cys
 6005 6010 6015
 Glu Gly Ser Cys Pro Gly Ala Ser Lys Tyr Ser Ala Glu Ala Gln
 6020 6025 6030

ES 2 581 841 T3

Ala Met Gln His Gln Cys Thr Cys Cys Gln Glu Arg Arg Val His
 6035 6040 6045
 Glu Glu Thr Val Pro Leu His Cys Pro Asn Gly Ser Ala Ile Leu
 6050 6055 6060
 His Thr Tyr Thr His Ala Val Gln Val Leu Cys Gly Leu Leu Ala
 6065 6070 6075
 Trp Gly Leu Gln Ala Gly Gly His Ile Arg Gly Ala Val Gln Asp
 6080 6085 6090
 Pro Gln Gln Pro Leu Lys Asp Gln Glu Ala Ser Gly Lys Ala Arg
 6095 6100 6105
 Gln Gly Gly Gly Tyr Arg Gln Thr Val Ala Trp Gly Asp Lys Ser
 6110 6115 6120
 Asn Ala Arg Ala Trp Leu Gln Lys Pro Val Val Trp Val Gln Ser
 6125 6130 6135
 Gly Ala Phe Pro Thr Pro Gly Pro Ala Ser Ala Leu Cys Pro Trp
 6140 6145 6150
 Lys Met Gly Ile Gln Pro Glu Thr Thr Lys Gln Leu Arg Asp Ala
 6155 6160 6165
 Asn Ile Leu Lys Glu Ser Lys Arg Ser Ile Ser Arg Glu Arg Gln
 6170 6175 6180
 Arg Gln Cys Ala Gln Ala Ile Arg Phe Asn Arg Gly Phe Gly Gly
 6185 6190 6195
 Gln Ile Trp Lys Ser Gln Arg Phe Phe
 6200 6205

<210> 5
 <211> 4493
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 5

Met Pro Arg Pro Gly Thr Met Ala Leu Cys Leu Leu Thr Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Pro Pro Gln Ala Ala Ala Glu Gln Asp Leu Ser Val Asn
 20 25 30
 Arg Ala Val Trp Asp Gly Gly Gly Cys Ile Ser Gln Gly Asp Val Leu
 35 40 45
 Asn Arg Gln Cys Gln Gln Leu Ser Gln His Val Arg Thr Gly Ser Ala
 50 55 60

5

10

ES 2 581 841 T3

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

Met Tyr Leu Ser Cys Ser Thr Asn Pro Glu Met Thr Ser Ile Glu Ser
85 90 95

Ser Val Thr Ser Asp Thr Pro Gly Val Ser Ser Thr Arg Met Thr Pro
100 105 110

Thr Glu Ser Arg Thr Thr Ser Glu Ser Thr Ser Asp Ser Thr Thr Leu
115 120 125

Phe Pro Ser Ser Thr Glu Asp Thr Ser Ser Pro Thr Thr Pro Glu Gly
130 135 140

Thr Asp Val Pro Met Ser Thr Pro Ser Glu Glu Ser Ile Ser Ser Thr
145 150 155 160

Met Ala Phe Val Ser Thr Ala Pro Leu Pro Ser Phe Glu Ala Tyr Thr
165 170 175

Ser Leu Thr Tyr Lys Val Asp Met Ser Thr Pro Leu Thr Thr Ser Thr
180 185 190

Gln Ala Ser Ser Ser Pro Thr Thr Pro Glu Ser Thr Thr Ile Pro Lys
195 200 205

Ser Thr Asn Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Ser Met Pro Ala Ser
210 215 220

Thr Met Lys Val Ala Ser Ser Glu Ala Ile Thr Leu Leu Thr Thr Pro
225 230 235 240

Val Glu Ile Ser Thr Pro Val Thr Ile Ser Ala Gln Ala Ser Ser Ser
245 250 255

Pro Thr Thr Ala Glu Gly Pro Ser Leu Ser Asn Ser Ala Pro Ser Gly
260 265 270

Gly Ser Thr Pro Leu Thr Arg Met Pro Leu Ser Val Met Leu Val Val
275 280 285

Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Ala Ala Thr Asn Ile
290 295 300

Pro Val Ile Thr Ser Thr Glu Ala Ser Ser Ser Pro Thr Thr Ala Glu
305 310 315 320

Gly Thr Ser Ile Pro Thr Ser Thr Tyr Thr Glu Gly Ser Thr Pro Leu
325 330 335

ES 2 581 841 T3

Thr Ser Thr Pro Ala Ser Thr Met Pro Val Ala Thr Ser Glu Met Ser
 340 345 350
 Thr Leu Ser Ile Thr Pro Val Asp Thr Ser Thr Leu Val Thr Thr Ser
 355 360 365
 Thr Glu Pro Ser Ser Leu Pro Thr Thr Ala Glu Ala Thr Ser Met Leu
 370 375 380
 Thr Ser Thr Leu Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Asn Met Pro Val
 385 390 395 400
 Ser Thr Ile Leu Val Ala Ser Ser Glu Ala Ser Thr Thr Ser Thr Ile
 405 410 415
 Pro Val Asp Ser Lys Thr Phe Val Thr Thr Ala Ser Glu Ala Ser Ser
 420 425 430
 Ser Pro Thr Thr Ala Glu Asp Thr Ser Ile Ala Thr Ser Thr Pro Ser
 435 440 445
 Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Ser Met Pro Val Ser Thr Thr Pro Val
 450 455 460
 Ala Ser Ser Glu Ala Ser Asn Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Ser Lys
 465 470 475 480
 Thr Gln Val Thr Thr Ser Thr Glu Ala Ser Ser Ser Pro Pro Thr Ala
 485 490 495
 Glu Val Asn Ser Met Pro Thr Ser Thr Pro Ser Glu Gly Ser Thr Pro
 500 505 510
 Leu Thr Ser Met Ser Val Ser Thr Met Pro Val Ala Ser Ser Glu Ala
 515 520 525
 Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr
 530 535 540
 Ser Ser Glu Ala Ser Ser Ser Ser Thr Thr Pro Glu Gly Thr Ser Ile
 545 550 555 560
 Pro Thr Ser Thr Pro Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Asn Met Pro
 565 570 575
 Val Ser Thr Arg Leu Val Val Ser Ser Glu Ala Ser Thr Thr Ser Thr
 580 585 590
 Thr Pro Ala Asp Ser Asn Thr Phe Val Thr Thr Ser Ser Glu Ala Ser
 595 600 605

ES 2 581 841 T3

Ser Ser Ser Thr Thr Ala Glu Gly Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr Tyr
 610 615 620
 Ser Glu Arg Gly Thr Thr Ile Thr Ser Met Ser Val Ser Thr Thr Leu
 625 630 635
 Val Ala Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Ser
 645 650 655
 Asn Thr Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Ala Thr Ser Ser Ser Thr Thr
 660 665 670
 Ala Glu Gly Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr Tyr Thr Glu Gly Ser Thr
 675 680 685
 Pro Leu Thr Ser Met Pro Val Asn Thr Thr Leu Val Ala Ser Ser Glu
 690 695 700
 Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr
 705 710 715 720
 Thr Ser Thr Glu Ala Ser Ser Ser Pro Thr Thr Ala Asp Gly Ala Ser
 725 730 735
 Met Pro Thr Ser Thr Pro Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Ser Met
 740 745 750
 Pro Val Ser Lys Thr Leu Leu Thr Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser
 755 760 765
 Thr Thr Pro Leu Asp Thr Ser Thr His Ile Thr Thr Ser Thr Glu Ala
 770 775 780
 Ser Cys Ser Pro Thr Thr Thr Glu Gly Thr Ser Met Pro Ile Ser Thr
 785 790 795 800
 Pro Ser Glu Gly Ser Pro Leu Leu Thr Ser Ile Pro Val Ser Ile Thr
 805 810 815
 Pro Val Thr Ser Pro Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp
 820 825 830
 Ser Asn Ser Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Val Ser Ser Ser Pro Thr
 835 840 845
 Pro Ala Glu Gly Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr Tyr Ser Glu Gly Arg
 850 855 860
 Thr Pro Leu Thr Ser Met Pro Val Ser Thr Thr Leu Val Ala Thr Ser
 865 870 875 880
 Ala Ile Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Thr Ser Thr Pro Val

ES 2 581 841 T3

			885					890							895
Thr	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Thr	Thr	Ser	Glu	Gly	Thr
			900					905					910		
Ser	Met	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr	Ser
		915					920					925			
Met	Pro	Asp	Ser	Thr	Thr	Pro	Val	Val	Ser	Ser	Glu	Ala	Arg	Thr	Leu
		930				935					940				
Ser	Ala	Thr	Pro	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu
945					950				955						960
Ala	Thr	Ser	Ser	Pro	Thr	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr	Ser	Ile	Pro	Thr	Ser
				965					970					975	
Thr	Pro	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Pro	Leu	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Ser	His
			980					985					990		
Thr	Leu	Val	Ala	Asn	Ser	Glu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ser	Thr	Thr	Pro	Val
		995					1000						1005		
Asp	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Ala	Ser	Ser	Pro	
	1010					1015					1020				
Pro	Pro	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr	Ser	Met	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Ser	
	1025					1030					1035				
Glu	Gly	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr	Arg	Met	Pro	Val	Ser	Thr	Thr	Met	
	1040					1045					1050				
Val	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	Ser	Thr	Leu	Ser	Thr	Thr	Pro	Ala	Asp	
	1055					1060					1065				
Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Thr	Tyr	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	
	1070					1075					1080				
Thr	Thr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ser	Met	Pro	Thr	Ser	Thr	Tyr	Ser	Glu	
	1085					1090					1095				
Gly	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Leu	Val	
	1100					1105					1110				
Val	Ser	Ser	Glu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ser	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Thr	
	1115					1120					1125				
Ser	Ile	Pro	Val	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	
	1130					1135					1140				
Thr	Ala	Glu	Gly	Thr	Ser	Ile	Pro	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Glu	Gly	
	1145					1150					1155				

Thr Thr Pro Leu Ala Ser Met Pro Val Ser Thr Thr Leu Val Val
 1160 1165 1170
 Ser Ser Glu Ala Asn Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Ser Lys
 1175 1180 1185
 Thr Gln Val Ala Thr Ser Thr Glu Ala Ser Ser Pro Pro Pro Thr
 1190 1195 1200
 Ala Glu Val Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ser
 1205 1210 1215
 Thr Pro Leu Thr Ser Met Pro Val Arg His Thr Pro Val Ala Ser
 1220 1225 1230
 Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Ser Pro Val Asp Thr Ser Thr
 1235 1240 1245
 Pro Val Thr Thr Ser Ala Glu Thr Ser Ser Ser Pro Thr Thr Ala
 1250 1255 1260
 Glu Gly Thr Ser Leu Pro Thr Ser Thr Thr Ser Glu Gly Ser Thr
 1265 1270 1275
 Leu Leu Thr Ser Ile Pro Val Ser Thr Thr Leu Val Thr Ser Pro
 1280 1285 1290
 Glu Ala Ser Thr Leu Leu Thr Thr Pro Val Asp Thr Lys Gly Pro
 1295 1300 1305
 Val Val Thr Ser Asn Glu Val Ser Ser Ser Pro Thr Pro Ala Glu
 1310 1315 1320
 Gly Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr Tyr Ser Glu Gly Arg Thr Pro
 1325 1330 1335
 Leu Thr Ser Ile Pro Val Asn Thr Thr Leu Val Ala Ser Ser Ala
 1340 1345 1350
 Ile Ser Ile Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Asn Ser Thr Pro Val
 1355 1360 1365
 Thr Thr Ser Thr Glu Ala Cys Ser Ser Pro Thr Thr Ser Glu Gly
 1370 1375 1380
 Thr Ser Met Pro Asn Ser Asn Pro Ser Glu Gly Thr Thr Pro Leu
 1385 1390 1395
 Thr Ser Ile Pro Val Ser Thr Thr Pro Val Val Ser Ser Glu Ala
 1400 1405 1410

ES 2 581 841 T3

Ser Thr Leu Ser Ala Thr Pro Val Asp Thr Ser Thr Pro Gly Thr
 1415 1420 1425
 Thr Ser Ala Glu Ala Thr Ser Ser Pro Thr Thr Ala Glu Gly Ile
 1430 1435 1440
 Ser Ile Pro Thr Ser Thr Pro Ser Glu Gly Lys Thr Pro Leu Lys
 1445 1450
 Ser Ile Pro Val Ser Asn Thr Pro Val Ala Asn Ser Glu Ala Ser
 1460 1465 1470
 Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Ser Asn Ser Pro Val Val Thr
 1475 1480 1485
 Ser Thr Ala Val Ser Ser Ser Pro Thr Pro Ala Glu Gly Thr Ser
 1490 1495 1500
 Ile Ala Ile Ser Thr Pro Ser Glu Gly Ser Thr Ala Leu Thr Ser
 1505 1510 1515
 Ile Pro Val Ser Thr Thr Thr Val Ala Ser Ser Glu Ile Asn Ser
 1520 1525 1530
 Leu Ser Thr Thr Pro Ala Val Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Tyr
 1535 1540 1545
 Ser Gln Ala Ser Ser Ser Pro Thr Thr Ala Asp Gly Thr Ser Met
 1550 1555 1560
 Gln Thr Ser Thr Tyr Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Ser Leu
 1565 1570 1575
 Pro Val Ser Thr Met Leu Val Val Ser Ser Glu Ala Asn Thr Leu
 1580 1585 1590
 Ser Thr Thr Pro Ile Asp Ser Lys Thr Gln Val Thr Ala Ser Thr
 1595 1600 1605
 Glu Ala Ser Ser Ser Thr Thr Ala Glu Gly Ser Ser Met Thr Ile
 1610 1615 1620
 Ser Thr Pro Ser Glu Gly Ser Pro Leu Leu Thr Ser Ile Pro Val
 1625 1630 1635
 Ser Thr Thr Pro Val Ala Ser Pro Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr
 1640 1645 1650
 Thr Pro Val Asp Ser Asn Ser Pro Val Ile Thr Ser Thr Glu Val
 1655 1660 1665

ES 2 581 841 T3

Ser Ser Ser Pro Thr Pro Ala Glu Gly Thr Ser Met Pro Thr Ser
 1670 1675 1680

Thr Tyr Thr Glu Gly Arg Thr Pro Leu Thr Ser Ile Thr Val Arg
 1685 1690 1695

Thr Thr Pro Val Ala Ser Ser Ala Ile Ser Thr Leu Ser Thr Thr
 1700 1705 1710

Pro Val Asp Asn Ser Thr Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Ala Arg
 1715 1720 1725

Ser Ser Pro Thr Thr Ser Glu Gly Thr Ser Met Pro Asn Ser Thr
 1730 1735 1740

Pro Ser Glu Gly Thr Thr Pro Leu Thr Ser Ile Pro Val Ser Thr
 1745 1750 1755

Thr Pro Val Leu Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Ala Thr Pro
 1760 1765 1770

Ile Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Ala Thr Ser
 1775 1780 1785

Ser Pro Thr Thr Ala Glu Gly Thr Ser Ile Pro Thr Ser Thr Leu
 1790 1795 1800

Ser Glu Gly Met Thr Pro Leu Thr Ser Thr Pro Val Ser His Thr
 1805 1810 1815

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val
 1820 1825 1830

Asp Ser Asn Ser Pro Val Val Thr Ser Thr Ala Val Ser Ser Ser
 1835 1840 1845

Pro Thr Pro Ala Glu Gly Thr Ser Ile Ala Thr Ser Thr Pro Ser
 1850 1855 1860

Glu Gly Ser Thr Ala Leu Thr Ser Ile Pro Val Ser Thr Thr Thr
 1865 1870 1875

Val Ala Ser Ser Glu Thr Asn Thr Leu Ser Thr Thr Pro Ala Val
 1880 1885 1890

Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Tyr Ala Gln Val Ser Ser Ser Pro
 1895 1900 1905

Thr Thr Ala Asp Gly Ser Ser Met Pro Thr Ser Thr Pro Arg Glu
 1910 1915 1920

Gly Arg Pro Pro Leu Thr Ser Ile Pro Val Ser Thr Thr Thr Val

ES 2 581 841 T3

1925			1930			1935		
Ala Ser 1940	Ser Glu Ile Asn	Thr 1945	Leu Ser Thr Thr	Leu 1950	Ala Asp Thr			
Arg Thr 1955	Pro Val Thr Thr	Tyr 1960	Ser Gln Ala Ser	Ser 1965	Ser Pro Thr			
Thr Ala 1970	Asp Gly Thr Ser	Met 1975	Pro Thr Pro Ala	Tyr 1980	Ser Glu Gly			
Ser Thr 1985	Pro Leu Thr Ser	Met 1990	Pro Leu Ser Thr	Thr 1995	Leu Val Val			
Ser Ser 2000	Glu Ala Ser Thr	Leu 2005	Ser Thr Thr Pro	Val 2010	Asp Thr Ser			
Thr Pro 2015	Ala Thr Thr Ser	Thr 2020	Glu Gly Ser Ser	Ser 2025	Pro Thr Thr			
Ala Gly 2030	Gly Thr Ser Ile	Gln 2035	Thr Ser Thr Pro	Ser 2040	Glu Arg Thr			
Thr Pro 2045	Leu Ala Gly Met	Pro 2050	Val Ser Thr Thr	Leu 2055	Val Val Ser			
Ser Glu 2060	Gly Asn Thr Leu	Ser 2065	Thr Thr Pro Val	Asp 2070	Ser Lys Thr			
Gln Val 2075	Thr Asn Ser Thr	Glu 2080	Ala Ser Ser Ser	Ala 2085	Thr Ala Glu			
Gly Ser 2090	Ser Met Thr Ile	Ser 2095	Ala Pro Ser Glu	Gly 2100	Ser Pro Leu			
Leu Thr 2105	Ser Ile Pro Leu	Ser 2110	Thr Thr Pro Val	Ala 2115	Ser Pro Glu			
Ala Ser 2120	Thr Leu Ser Thr	Thr 2125	Pro Val Asp Ser	Asn 2130	Ser Pro Val			
Ile Thr 2135	Ser Thr Glu Val	Ser 2140	Ser Ser Pro Ile	Pro 2145	Thr Glu Gly			
Thr Ser 2150	Met Gln Thr Ser	Thr 2155	Tyr Ser Asp Arg	Arg 2160	Thr Pro Leu			
Thr Ser 2165	Met Pro Val Ser	Thr 2170	Thr Val Val Ala	Ser 2175	Ser Ala Ile			
Ser Thr 2180	Leu Ser Thr Thr	Pro 2185	Val Asp Thr Ser	Thr 2190	Pro Val Thr			

ES 2 581 841 T3

Asn Ser Thr Glu Ala Arg Ser Ser Pro Thr Thr Ser Glu Gly Thr
 2195 2200 2205
 Ser Met Pro Thr Ser Thr Pro Ser Glu Gly Ser Thr Pro Phe Thr
 2210 2215 2220
 Ser Met Pro Val Ser Thr Met Pro Val Val Thr Ser Glu Ala Ser
 2225 2230 2235
 Thr Leu Ser Ala Thr Pro Val Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr
 2240 2245 2250
 Ser Thr Glu Ala Thr Ser Ser Pro Thr Thr Ala Glu Gly Thr Ser
 2255 2260 2265
 Ile Pro Thr Ser Thr Leu Ser Glu Gly Thr Thr Pro Leu Thr Ser
 2270 2275 2280
 Ile Pro Val Ser His Thr Leu Val Ala Asn Ser Glu Val Ser Thr
 2285 2290 2295
 Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Ser Asn Thr Pro Phe Thr Thr Ser
 2300 2305 2310
 Thr Glu Ala Ser Ser Pro Pro Pro Thr Ala Glu Gly Thr Ser Met
 2315 2320 2325
 Pro Thr Ser Thr Ser Ser Glu Gly Asn Thr Pro Leu Thr Arg Met
 2330 2335 2340
 Pro Val Ser Thr Thr Met Val Ala Ser Phe Glu Thr Ser Thr Leu
 2345 2350 2355
 Ser Thr Thr Pro Ala Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Tyr Ser
 2360 2365 2370
 Gln Ala Gly Ser Ser Pro Thr Thr Ala Asp Asp Thr Ser Met Pro
 2375 2380 2385
 Thr Ser Thr Tyr Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Ser Val Pro
 2390 2395 2400
 Val Ser Thr Met Pro Val Val Ser Ser Glu Ala Ser Thr His Ser
 2405 2410 2415
 Thr Thr Pro Val Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu
 2420 2425 2430
 Ala Ser Ser Ser Pro Thr Thr Ala Glu Gly Thr Ser Ile Pro Thr
 2435 2440 2445

ES 2 581 841 T3

Ser Pro Pro Ser Glu Gly Thr Thr Pro Leu Ala Ser Met Pro Val
 2450 2455 2460

Ser Thr Thr Pro Val Val Ser Ser Glu Ala Gly Thr Leu Ser Thr
 2465 2470 2475

Thr Pro Val Asp Thr Ser Thr Pro Met Thr Thr Ser Thr Glu Ala
 2480 2485 2490

Ser Ser Ser Pro Thr Thr Ala Glu Asp Ile Val Val Pro Ile Ser
 2495 2500 2505

Thr Ala Ser Glu Gly Ser Thr Leu Leu Thr Ser Ile Pro Val Ser
 2510 2515 2520

Thr Thr Pro Val Ala Ser Pro Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr
 2525 2530 2535

Pro Val Asp Ser Asn Ser Pro Val Val Thr Ser Thr Glu Ile Ser
 2540 2545 2550

Ser Ser Ala Thr Ser Ala Glu Gly Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr
 2555 2560 2565

Tyr Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Arg Ser Met Pro Val Ser Thr
 2570 2575 2580

Lys Pro Leu Ala Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro
 2585 2590 2595

Val Asp Thr Ser Ile Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Thr Ser Ser
 2600 2605 2610

Ser Pro Thr Thr Ala Lys Asp Thr Ser Met Pro Ile Ser Thr Pro
 2615 2620 2625

Ser Glu Val Ser Thr Ser Leu Thr Ser Ile Leu Val Ser Thr Met
 2630 2635 2640

Pro Val Ala Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val
 2645 2650 2655

Asp Thr Arg Thr Leu Val Thr Thr Ser Thr Gly Thr Ser Ser Ser
 2660 2665 2670

Pro Thr Thr Ala Glu Gly Ser Ser Met Pro Thr Ser Thr Pro Gly
 2675 2680 2685

Glu Arg Ser Thr Pro Leu Thr Asn Ile Leu Val Ser Thr Thr Leu
 2690 2695 2700

ES 2 581 841 T3

Leu Ala Asn Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp
 2705 2710 2715
 Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Ser Ala Glu Ala Ser Ser Ser Pro
 2720 2725 2730
 Thr Thr Ala Glu Gly Thr Ser Met Arg Ile Ser Thr Pro Ser Asp
 2735 2740 2745
 Gly Ser Thr Pro Leu Thr Ser Ile Leu Val Ser Thr Leu Pro Val
 2750 2755 2760
 Ala Ser Ser Glu Ala Ser Thr Val Ser Thr Thr Ala Val Asp Thr
 2765 2770 2775
 Ser Ile Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Ala Ser Ser Ser Pro Thr
 2780 2785 2790
 Thr Ala Glu Val Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr Pro Ser Glu Thr
 2795 2800 2805
 Ser Thr Pro Leu Thr Ser Met Pro Val Asn His Thr Pro Val Ala
 2810 2815 2820
 Ser Ser Glu Ala Gly Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Thr Ser
 2825 2830 2835
 Thr Pro Val Thr Thr Ser Thr Lys Ala Ser Ser Ser Pro Thr Thr
 2840 2845 2850
 Ala Glu Gly Ile Val Val Pro Ile Ser Thr Ala Ser Glu Gly Ser
 2855 2860 2865
 Thr Leu Leu Thr Ser Ile Pro Val Ser Thr Thr Pro Val Ala Ser
 2870 2875 2880
 Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Thr Ser Ile
 2885 2890 2895
 Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Gly Ser Ser Ser Pro Thr Thr Ala
 2900 2905 2910
 Glu Gly Thr Ser Met Pro Ile Ser Thr Pro Ser Glu Val Ser Thr
 2915 2920 2925
 Pro Leu Thr Ser Ile Leu Val Ser Thr Val Pro Val Ala Gly Ser
 2930 2935 2940
 Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp Thr Arg Thr Pro
 2945 2950 2955
 Val Thr Thr Ser Ala Glu Ala Ser Ser Ser Pro Thr Thr Ala Glu

ES 2 581 841 T3

2960				2965				2970						
Gly	Thr	Ser	Met	Pro	Ile	Ser	Thr	Pro	Gly	Glu	Arg	Arg	Thr	Pro
	2975					2980					2985			
Leu	Thr	Ser	Met	Ser	Val	Ser	Thr	Met	Pro	Val	Ala	Ser	Ser	Glu
	2990					2995					3000			
Ala	Ser	Thr	Leu	Ser	Arg	Thr	Pro	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Pro	Val
	3005					3010					3015			
Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	Thr	Ala	Glu	Gly
	3020					3025					3030			
Thr	Gly	Ile	Pro	Ile	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Thr	Pro	Leu
	3035					3040					3045			
Thr	Ser	Ile	Pro	Val	Ser	Thr	Thr	Pro	Val	Ala	Ile	Pro	Glu	Ala
	3050					3055					3060			
Ser	Thr	Leu	Ser	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Asn	Ser	Pro	Val	Val
	3065					3070					3075			
Thr	Ser	Thr	Glu	Val	Ser	Ser	Pro	Thr	Pro	Ala	Glu	Gly	Thr	
	3080					3085				3090				
Ser	Met	Pro	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ser	Glu	Gly	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr
	3095					3100					3105			
Gly	Val	Pro	Val	Ser	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Ser	Ser	Ala	Ile	Ser
	3110					3115					3120			
Thr	Leu	Ser	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Thr
	3125					3130					3135			
Ser	Thr	Glu	Ala	His	Ser	Ser	Pro	Thr	Thr	Ser	Glu	Gly	Thr	Ser
	3140					3145					3150			
Met	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr	Tyr
	3155					3160					3165			
Met	Pro	Val	Ser	Thr	Met	Leu	Val	Val	Ser	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr
	3170					3175					3180			
Leu	Ser	Ala	Thr	Pro	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Thr	Ser
	3185					3190					3195			
Thr	Glu	Ala	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr	Ser	Ile	Pro
	3200					3205					3210			
Thr	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Gly	Met	Thr	Pro	Leu	Thr	Ser	Val	Pro
	3215					3220					3225			

ES 2 581 841 T3

Val Ser Asn Thr Pro Val Ala Ser Ser Glu Ala Ser Ile Leu Ser
 3230 3235 3240

Thr Thr Pro Val Asp Ser Asn Thr Pro Leu Thr Thr Ser Thr Glu
 3245 3250 3255

Ala Ser Ser Ser Pro Pro Thr Ala Glu Gly Thr Ser Met Pro Thr
 3260 3265 3270

Ser Thr Pro Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Ser Met Pro Val
 3275 3280 3285

Ser Thr Thr Thr Val Ala Ser Ser Glu Thr Ser Thr Leu Ser Thr
 3290 3295 3300

Thr Pro Ala Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Tyr Ser Gln Ala
 3305 3310 3315

Ser Ser Ser Pro Pro Ile Ala Asp Gly Thr Ser Met Pro Thr Ser
 3320 3325 3330

Thr Tyr Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Asn Met Ser Phe Ser
 3335 3340 3345

Thr Thr Pro Val Val Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr
 3350 3355 3360

Pro Val Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Ala Ser
 3365 3370 3375

Leu Ser Pro Thr Thr Ala Glu Gly Thr Ser Ile Pro Thr Ser Ser
 3380 3385 3390

Pro Ser Glu Gly Thr Thr Pro Leu Ala Ser Met Pro Val Ser Thr
 3395 3400 3405

Thr Pro Val Val Ser Ser Glu Val Asn Thr Leu Ser Thr Thr Pro
 3410 3415 3420

Val Asp Ser Asn Thr Leu Val Thr Thr Ser Thr Glu Ala Ser Ser
 3425 3430 3435

Ser Pro Thr Ile Ala Glu Gly Thr Ser Leu Pro Thr Ser Thr Thr
 3440 3445 3450

Ser Glu Gly Ser Thr Pro Leu Ser Ile Met Pro Leu Ser Thr Thr
 3455 3460 3465

Pro Val Ala Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val
 3470 3475 3480

ES 2 581 841 T3

Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr Thr Ser Ser Pro Thr Asn Ser Ser
 3485 3490 3495
 Pro Thr Thr Ala Glu Val Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr Ala Gly
 3500 3505 3510
 Glu Gly Ser Thr Pro Leu Thr Asn Met Pro Val Ser Thr Thr Pro
 3515 3520 3525
 Val Ala Ser Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp
 3530 3535 3540
 Ser Asn Thr Phe Val Thr Ser Ser Ser Gln Ala Ser Ser Ser Pro
 3545 3550 3555
 Ala Thr Leu Gln Val Thr Thr Met Arg Met Ser Thr Pro Ser Glu
 3560 3565 3570
 Gly Ser Ser Ser Leu Thr Thr Met Leu Leu Ser Ser Thr Tyr Val
 3575 3580 3585
 Thr Ser Ser Glu Ala Ser Thr Pro Ser Thr Pro Ser Val Asp Arg
 3590 3595 3600
 Ser Thr Pro Val Thr Thr Ser Thr Gln Ser Asn Ser Thr Pro Thr
 3605 3610 3615
 Pro Pro Glu Val Ile Thr Leu Pro Met Ser Thr Pro Ser Glu Val
 3620 3625 3630
 Ser Thr Pro Leu Thr Ile Met Pro Val Ser Thr Thr Ser Val Thr
 3635 3640 3645
 Ile Ser Glu Ala Gly Thr Ala Ser Thr Leu Pro Val Asp Thr Ser
 3650 3655 3660
 Thr Pro Val Ile Thr Ser Thr Gln Val Ser Ser Ser Pro Val Thr
 3665 3670 3675
 Pro Glu Gly Thr Thr Met Pro Ile Trp Thr Pro Ser Glu Gly Ser
 3680 3685 3690
 Thr Pro Leu Thr Thr Met Pro Val Ser Thr Thr Arg Val Thr Ser
 3695 3700 3705
 Ser Glu Gly Ser Thr Leu Ser Thr Pro Ser Val Val Thr Ser Thr
 3710 3715 3720
 Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Ala Ile Ser Ser Ser Ala Thr Leu
 3725 3730 3735

ES 2 581 841 T3

Asp Ser Thr Thr Met Ser Val Ser Met Pro Met Glu Ile Ser Thr
 3740 3745 3750
 Leu Gly Thr Thr Ile Leu Val Ser Thr Thr Pro Val Thr Arg Phe
 3755 3760 3765
 Pro Glu Ser Ser Thr Pro Ser Ile Pro Ser Val Tyr Thr Ser Met
 3770 3775 3780
 Ser Met Thr Thr Ala Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Thr Thr Leu
 3785 3790 3795
 Glu Gly Thr Thr Thr Met Pro Met Ser Thr Thr Ser Glu Arg Ser
 3800 3805 3810
 Thr Leu Leu Thr Thr Val Leu Ile Ser Pro Ile Ser Val Met Ser
 3815 3820 3825
 Pro Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ser Thr Pro Pro Gly Asp Thr Ser
 3830 3835 3840
 Thr Pro Leu Leu Thr Ser Thr Lys Ala Gly Ser Phe Ser Ile Pro
 3845 3850 3855
 Ala Glu Val Thr Thr Ile Arg Ile Ser Ile Thr Ser Glu Arg Ser
 3860 3865 3870
 Thr Pro Leu Thr Thr Leu Leu Val Ser Thr Thr Leu Pro Thr Ser
 3875 3880 3885
 Phe Pro Gly Ala Ser Ile Ala Ser Thr Pro Pro Leu Asp Thr Ser
 3890 3895 3900
 Thr Thr Phe Thr Pro Ser Thr Asp Thr Ala Ser Thr Pro Thr Ile
 3905 3910 3915
 Pro Val Ala Thr Thr Ile Ser Val Ser Val Ile Thr Glu Gly Ser
 3920 3925 3930
 Thr Pro Gly Thr Thr Ile Phe Ile Pro Ser Thr Pro Val Thr Ser
 3935 3940 3945
 Ser Thr Ala Asp Val Phe Pro Ala Thr Thr Gly Ala Val Ser Thr
 3950 3955 3960
 Pro Val Ile Thr Ser Thr Glu Leu Asn Thr Pro Ser Thr Ser Ser
 3965 3970 3975
 Ser Ser Thr Thr Thr Ser Phe Ser Thr Thr Lys Glu Phe Thr Thr
 3980 3985 3990
 Pro Ala Met Thr Thr Ala Ala Pro Leu Thr Tyr Val Thr Met Ser

ES 2 581 841 T3

3995				4000				4005						
Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Pro	Arg	Thr	Thr	Ser	Arg	Gly	Cys	Thr	Thr
	4010					4015					4020			
Ser	Ala	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Thr	Pro	His	Thr	Ser	Thr
	4025					4030					4035			
Ser	Val	Thr	Thr	Arg	Pro	Val	Thr	Pro	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Arg
	4040					4045					4050			
Pro	Ser	Thr	Ile	Thr	Ser	His	Thr	Ile	Pro	Pro	Thr	Phe	Pro	Pro
	4055					4060					4065			
Ala	His	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr
	4070					4075					4080			
Val	Asn	Pro	Glu	Ala	Val	Thr	Thr	Met	Thr	Thr	Arg	Thr	Lys	Pro
	4085					4090					4095			
Ser	Thr	Arg	Thr	Thr	Ser	Phe	Pro	Thr	Val	Thr	Thr	Thr	Ala	Val
	4100					4105					4110			
Pro	Thr	Asn	Thr	Thr	Ile	Lys	Ser	Asn	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr
	4115					4120					4125			
Val	Pro	Arg	Thr	Thr	Thr	Cys	Phe	Gly	Asp	Gly	Cys	Gln	Asn	Thr
	4130					4135					4140			
Ala	Ser	Arg	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Thr	Trp	Asp	Gly	Leu	Lys	Cys
	4145					4150					4155			
Gln	Cys	Pro	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Leu	Cys	Glu	Glu	Val	Val
	4160					4165					4170			
Ser	Ser	Ile	Asp	Ile	Gly	Pro	Pro	Glu	Thr	Ile	Ser	Ala	Gln	Met
	4175					4180					4185			
Glu	Leu	Thr	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Val	Lys	Phe	Thr	Glu	Glu	Leu
	4190					4195					4200			
Lys	Asn	His	Ser	Ser	Gln	Glu	Phe	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln	Thr	Phe
	4205					4210					4215			
Thr	Glu	Gln	Met	Asn	Ile	Val	Tyr	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Tyr	Val
	4220					4225					4230			
Gly	Val	Asn	Ile	Thr	Lys	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Val	Val	Glu
	4235					4240					4245			
His	Asp	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Lys	Tyr	Thr	Pro	Glu	Tyr	Lys	Thr
	4250					4255					4260			

ES 2 581 841 T3

Val Leu Asp Asn Ala Thr Glu Val Val Lys Glu Lys Ile Thr Lys
 4265 4270 4275
 Val Thr Thr Gln Gln Ile Met Ile Asn Asp Ile Cys Ser Asp Met
 4280 4285 4290
 Met Cys Phe Asn Thr Thr Gly Thr Gln Val Gln Asn Ile Thr Val
 4295 4300 4305
 Thr Gln Tyr Asp Pro Glu Glu Asp Cys Arg Lys Met Ala Lys Glu
 4310 4315 4320
 Tyr Gly Asp Tyr Phe Val Val Glu Tyr Arg Asp Gln Lys Pro Tyr
 4325 4330 4335
 Cys Ile Ser Pro Cys Glu Pro Gly Phe Ser Val Ser Lys Asn Cys
 4340 4345 4350
 Asn Leu Gly Lys Cys Gln Met Ser Leu Ser Gly Pro Gln Cys Leu
 4355 4360 4365
 Cys Val Thr Thr Glu Thr His Trp Tyr Ser Gly Glu Thr Cys Asn
 4370 4375 4380
 Gln Gly Thr Gln Lys Ser Leu Val Tyr Gly Leu Val Gly Ala Gly
 4385 4390 4395
 Val Val Leu Met Leu Ile Ile Leu Val Ala Leu Leu Met Leu Val
 4400 4405 4410
 Phe Arg Ser Lys Arg Glu Val Lys Arg Gln Lys Tyr Arg Leu Ser
 4415 4420 4425
 Gln Leu Tyr Lys Trp Gln Glu Glu Asp Ser Gly Pro Ala Pro Gly
 4430 4435 4440
 Thr Phe Gln Asn Ile Gly Phe Asp Ile Cys Gln Asp Asp Asp Ser
 4445 4450 4455
 Ile His Leu Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Phe Gln Pro Ser Leu Arg
 4460 4465 4470
 His Ile Asp Pro Glu Thr Lys Ile Arg Ile Gln Arg Pro Gln Val
 4475 4480 4485
 Met Thr Thr Ser Phe
 4490

<210> 6
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Humano

5

<400> 6

ES 2 581 841 T3

Met Leu Thr Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Cys Ala Ser Ala Ser Gly
 1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Ala Arg Ser Ser Ser Tyr Ser Gly Glu Tyr Gly Ser
 20 25 30

Gly Gly Gly Lys Arg Phe Ser His Ser Gly Asn Gln Leu Asp Gly Pro
 35 40 45

Ile Thr Ala Leu Arg Val Arg Val Asn Thr Tyr Tyr Ile Val Gly Leu
 50 55 60

Gln Val Arg Tyr Gly Lys Val Trp Ser Asp Tyr Val Gly Gly Arg Asn
 65 70 75 80

Gly Asp Leu Glu Glu Ile Phe Leu His Pro Gly Glu Ser Val Ile Gln
 85 90 95

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

Asp Lys Gly Arg Tyr Leu Ser Phe Gly Lys Asp Ser Gly Thr Ser Phe
 115 120 125

Asn Ala Val Pro Leu His Pro Asn Thr Val Leu Arg Phe Ile Ser Gly
 130 135 140

Arg Ser Gly Ser Leu Ile Asp Ala Ile Gly Leu His Trp Asp Val Tyr
 145 150 155 160

Pro Thr Ser Cys Ser Arg Cys
 165

REIVINDICACIONES

1.- Un método para detectar el cáncer gástrico, que comprende:

- (i) proporcionar una muestra de sangre, plasma o suero;
- (ii) detectar los niveles de proteína del gránulo de zimógeno humana 16 ("ZG16") en dicha muestra; y

5 (iii) comparar la cantidad de ZG16 en dicha muestra con un valor obtenido a partir de una o más muestras control que no tienen cáncer gástrico,

en el que la sobreexpresión de ZG16 en la muestra biológica es indicativa de cáncer gástrico.

2.- El método de la reivindicación 1, que comprende detectar el nivel de uno o más miembros adicionales de la familiaGTM.

10 3.- El método de la reivindicación 2, en el que:

(i) dicho método comprende además detectar los niveles de un miembro adicional de la familia de GTM seleccionado del grupo que consiste en mucina 5AC ("MUC5AC"), y mucina 17 ("MUC17"); y/o

(ii) el o los miembros adicionales de la familia de GTM se seleccionan de MUC5AC, MUC17, ZG16, cadena de 83 kDa del polipéptido 2 de la carboxipeptidasa N ("CPN2"), metaloproteínasa de matriz 12 ("MMP12"), inhibina ("INHBA"), factor del crecimiento de tipo insulínico 7 ("IGFBP7"), gamma-glutamil hidrolasa ("GGH"), proteoglicano enriquecido en leucina y prolina ("LEPRE1"), cistatina S ("CST4"), proteína relacionada con frizzled segregada 4 ("SFRP4"), asporina ("ASP"), regulador del crecimiento celular con dominio de mano EF 1 ("CGREF1"), calicreína 10 (KLK10), inhibidor tisular de metaloproteínasa 1 ("TIMP1"), proteína rica en cisteína ácida segregada ("SPARC"), factor del crecimiento transformante, β-inducido ("TGFB1"), proteína de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 2 ("EFEMP2"), lumicano ("LUM"), estanina ("SNN"), fosfoproteína segregada 1 ("SPP1"), proteoglicano de sulfato de condroitina 2 ("CSPG2"), N-acilesfingosina amidohidrolasa ("ASA1"), serina proteasa 11 ("PRSS11"), proteína relacionada con frizzled segregada 2 ("SFRP2"), fosfolipasa A2, grupo XIIB ("PLA2G12B"), espondina 2, proteína de la matriz extracelular ("SPON2"), olfactomedina 1 ("OLFM1"), repetición de tromboespondina que contiene 1 ("TSRC1"), tromboespondina 2 ("THBS2"), adicano, cistatina SA ("CST2"), cistatina SN ("CST1"), enzima de tipo lisil oxidasa 2 ("LOXL2"), tiroglobulina ("TG"), factor del crecimiento transformante beta1 ("TGFB1"), inhibidor de serina o cisteína proteinasa Clado H, miembro 1 ("SERPINH1"), inhibidor de serina o cisteína proteinasa Clado B, miembro 5 ("SERPINB5"), metaloproteínasa de matriz 2 ("MMP2"), proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 5 ("PCSK5"), proteína de enlace de glicoproteína de hialuronano 4 ("HAPLN4"), CA19-9, CA72-4, pepsinógeno, y CEA; y/o

30 (iii) los marcadores de GTM ensayados comprenden MUC5AC, MUC17, ZG16, cistatina SN, serpina H1 y serpina B5.

4.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

- (i) dicha etapa de detección se realiza detectando los niveles de una proteína de GTM; o
- (ii) dicha etapa de detección se realiza detectando los niveles de un péptido de GTM.

35 5.- El método de la reivindicación 4, en el que dicha etapa de detección se realiza empleando un anticuerpo dirigido contra dicho GTM, opcionalmente en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, o un antisuero policlonal.

6.- El método de la reivindicación 4 o 5, en el que dicha etapa de detección se realiza empleando un método de inmunoensayo de tipo "sandwich", o empleando un chip de anticuerpos.

40 7.- El uso de un anticuerpo específico para la proteína del gránulo de zimógeno humana 16 ("ZG16") para detectar el cáncer gástrico en una muestra de sangre, plasma o suero.

Figura 1

Nombre	Símbolo	MWG oligo	Ref. de la secuencia de ARNm de Unigene	Ref. de la secuencia de proteína	Clasific. de intensidad (tumor)	Clasific. de intensidad (no maligno)
Mucina 5, subtipos A y C	MUC5AC	30 K,#B: 7561	NM_017511	NP_059981	404	328
Mucina 17, asociada a la superficie celular	MUC17	30 K,#C: 0346	NM_001040105	NP_001035194	2043	1485
Proteína del gránulo de zimógeno 16	ZG16	30 K,#C: 0156	NM_152338	NP_689551	3606	3249
Molécula de adhesión a células relacionada con el antígeno carcinoembrionario	CEACAM5	30 K,#B: 5440	NM_004363	NP_004354	4873	7668

Figura 2

Pacientes con cáncer gástrico		Controles	
Estadio T1	2	Cáncer colorrectal estadio T2	1
Estadio T2	15	Cáncer colorrectal estadio T3	9
Estadio T3	13	Cáncer colorrectal estadio T4	1
Estadio T4	1	Cáncer colorrectal después de cirugía	7
Tumores estomáticos gastrointestinales	2	Enfermedad no maligna	10
		Sanos	13
TOTAL	33	TOTAL	41

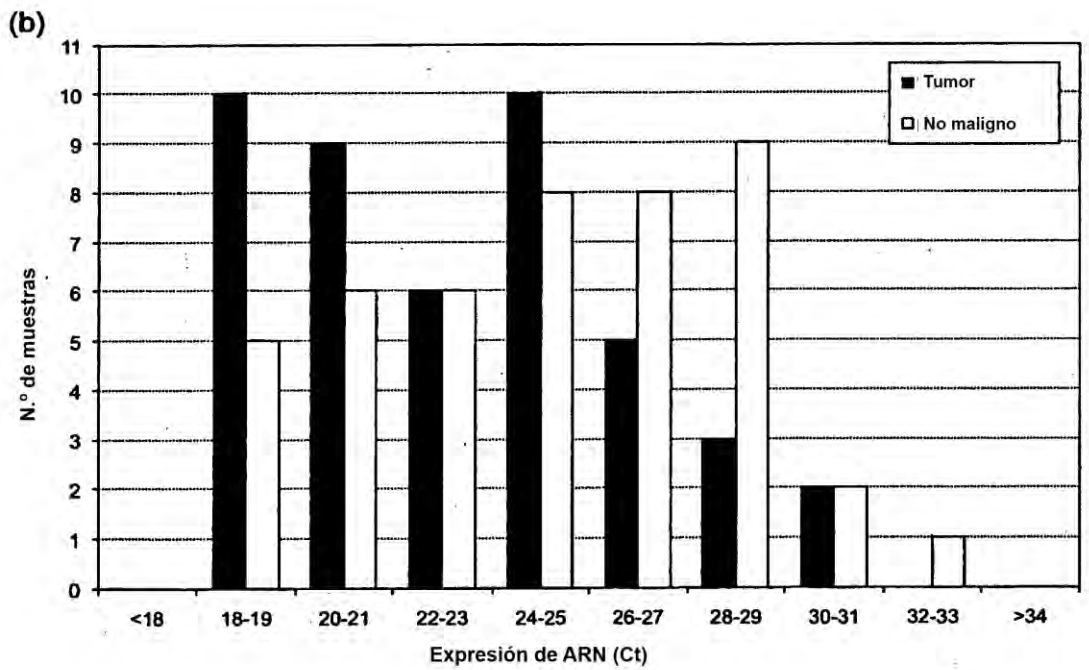
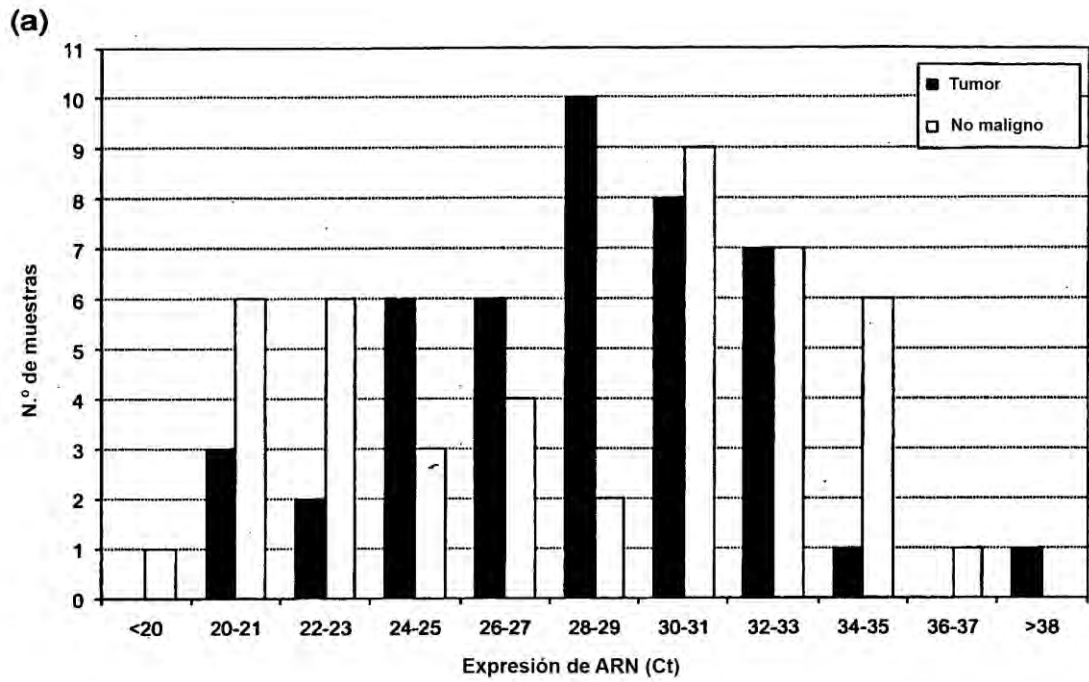


Figura 3

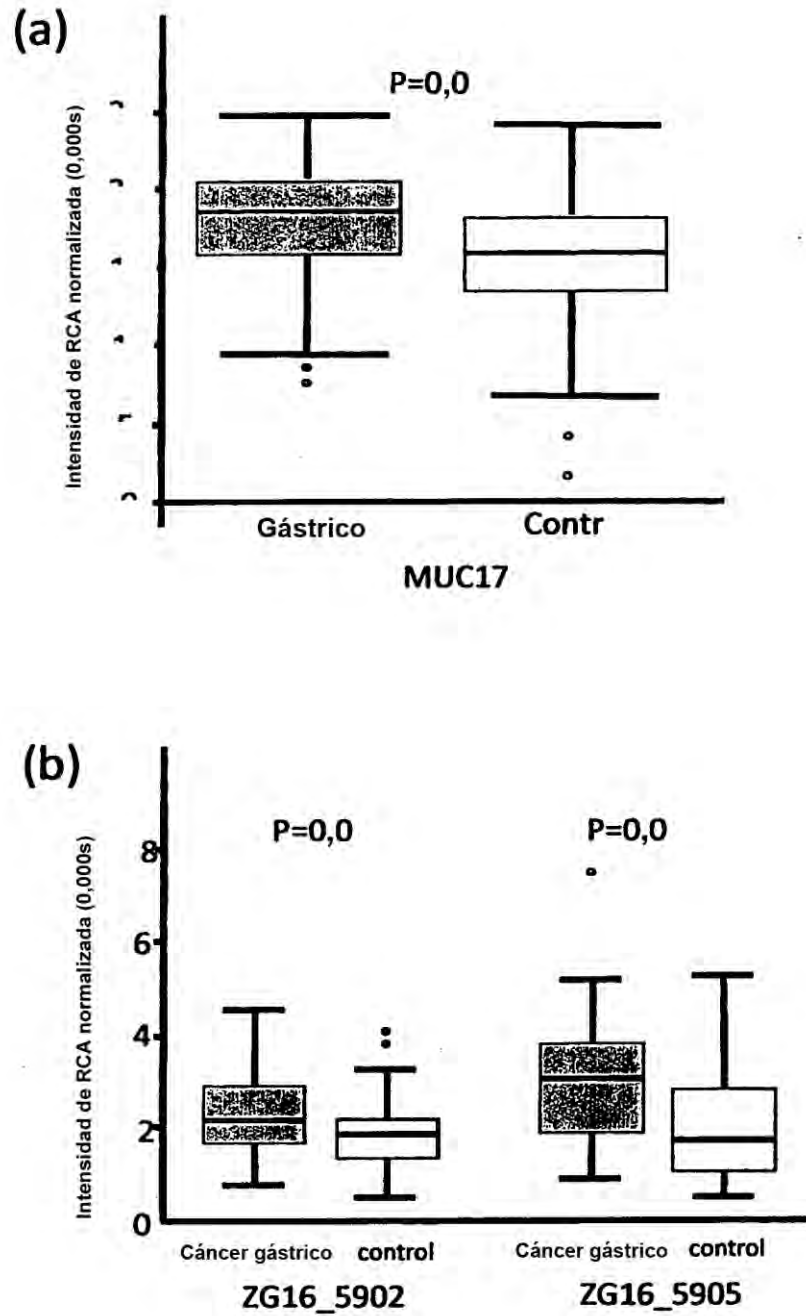


Figura 4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2005010213 A [0004]
- WO 02100336 A [0004]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **LIANG et al.** *Proceedings of the American Associate for Cancer Research Annual Meeting*, April 2005, vol. 46, 452 [0004]
- **M. SCHENA.** *Microarray Analysis*. John Wiley & Sons, 2002 [0038]
- *Microarray Biochip Technology*. Eaton Publishing, 2000 [0038]
- **S. KNUDSEN.** *Guide to Analysis of DNA Microarray Data*. John Wiley & Sons, 2004 [0038]
- *Protein Microarray Technology*. John Wiley & Sons, 2004 [0038]
- *PCR Technique: Quantitative PCR*. Eaton Publishing, 1997 [0043]
- *A-Z of Quantitative PCR*. IUL Press, 2004 [0043]
- **AUSUBEL et al.** *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience Publishers, 1995 [0045]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0047]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 [0051]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0051]
- *Animal Cell Culture*. 1987 [0051]
- *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc, [0051]
- *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Science Inc, 1987 [0051]
- *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*. 1987 [0051]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. 1987 [0051]
- *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. 1994 [0051]
- **SAMBROOK, J. ; E FRITSCH, E. ; T MANIATIS.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0059] [0079]
- **HELD et al.** *Genome Research*, 1996, vol. 6, 986-994 [0067]
- **KENT, W. J.** *Genome Res.*, 2002, vol. 12 (4), 656-64 [0068]
- *Primer3 on the VIMNV for general users and for biologist programmers.* **STEVE ROZEN ; HELEN J. SKALETSKY.** *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2000, 365-386 [0069]
- **DIEFFENBACH, C. W. et al.** *General Concepts for PCR Primer Design in: PCR Primer, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995, 133-155 [0070]
- **INNIS ; GELFAND.** *Optimization of PCRs in: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. CRC Press, 1994, 5-11 [0070]
- **PLASTERER, T. N.** *Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol.*, 1997, vol. 70, 520-527 [0070]
- **SCHENA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93 (2), 106-149 [0074]
- **AUSUBEL et al.** *Current Protocols of Molecular Biology*. John Wiley and Sons, 1997 [0075]
- **RUPP ; LOCKER.** *Lab Invest.*, 1987, vol. 56, A67 [0075]
- **DE SANDRES et al.** *BioTechniques*, 1995, vol. 18, 42044 [0075]
- **T. E. GODFREY et al.** *J. Molec. Diagnostics*, 2000, vol. 2, 84-91 [0076]
- **K. SPECHT et al.** *Am. J. Pathol.*, 2001, vol. 158, 419-29 [0076]
- **NOLTE, F.S.** *Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens. Adv. Clin. Chem.*, 1998, vol. 33, 201-35 [0079]
- **HAUKANES, B-1 ; KVAM, C.** *Application of magnetic beads in bioassays. BiolTechnology*, 1993, vol. 11, 60-63 [0079]
- **SPIRO, A. ; LOWE, M. ; BROWN, D.** *A Bead-Based Method for Multiplexed Identification and Quantitation of DNA Sequences Using Flow Cytometry. Appl. Env. Micro.*, 2000, vol. 66, 4258-4265 [0079]
- **CROWTHER, J.R.** *The ELISA guidebook*. Humana Press, 2000 [0082]
- **HARLOW, E. ; LANE, D.** *Using antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0082] [0085]
- **HUST M. ; DUBEL S.** *Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments. Methods Mol Biol.*, 2005, vol. 295, 71-96 [0082]

- **YOSHIKAWA et al.** describes tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with gastric cancer. *Cancer Letters*, 2000, vol. 151, 81-86 [0103]
- **RUDLAND et al.** describes osteopontin as a metastasis associated protein in human breast cancer. *Cancer Research*, 2002, vol. 62, 3417-3427 [0103]
- 5 • **BUCKHAULTS et al.** describes certain secreted and cell surface genes expressed in colorectal tumors. *Cancer Research*, 2002, vol. 61, 6996-7001 [0103]
- **KIM et al.** describes osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA*, 2002, vol. 287 (13), 1671-1679 [0103]
- **HOTTE et al.** describes plasma osteopontin as a protein detectable in human body fluids and is associated with certain malignancies. *AJ. American Cancer Society*, 2002, vol. 95 (3), 507-512 [0103]
- 10 • **MARTIN et al.** described use of human kallikrein 2, prostate-specific antigen (PSA) and free PSA as markers for detection of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 09 March 2004 [0103]
- **HALL et al.** described predictive value of serum thyroglobulin in thyroid cancer. *Laryngoscope*, 2003, vol. 113 (1), 77-81 [0103]
- 15 • **MAZZAFERRI et al.** describes thyroglobulin as a potential monitoring method for patients with thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, vol. 88 (4), 1433-1441 [0103]
- **WHITLEY et al.** describes thyroglobulin as a serum marker for thyroid carcinoma. *Dim Lab. Med.*, 2004, vol. 24 (1), 29-47 [0103]
- **KUO et al.** describes serum matrix metalloproteinase-2 and -9 in HCF- and HBV-infected patients. *Clin. Chim. Acta*, 2000, vol. 294 (1-2), 157-168 [0103]
- **KOOPMAN et al.** describes osteopontin as a biomarker for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Pre*, 2004, vol. 13 (3), 487-491 [0103]
- **PELLEGRINI et al.** describes measurement of soluble carcinoembryonic antigen and TIMP 1 as markers for pre-invasive colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2000, vol. 49 (7), 388-394 [0103]
- **MELLE et al.** describes HSP27 as a serum marker for pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Chem.*, 2007, vol. 53 (4), 629-635 [0103]
- **LEMAN et al.** describes EPCA-2 as a serum marker for prostate cancer. *Urology*, 2007, vol. 69 (4), 714-20 [0103]
- **TSIGKOU et al.** describes total inhibin as a potential serum marker for ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, vol. 92 (7), 2526-31 [0103]
- **MARCHI et al.** describes ProApolipoprotein AI as a serum marker of brain metastases in lung cancer patients. *Cancer*, 2008, vol. 112, 1313-1324 [0103]
- **HAAB BB ; LIZARDI PM.** RCA-enhanced protein detection arrays. *Methods Mol Biol.*, 2006, vol. 328, 15-29 [0116]