

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 646**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2008 PCT/JP2008/069275**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2009 WO09054475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008 E 08842391 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2207037**

54 Título: **Método para la detección de un cáncer**

30 Prioridad:

**25.10.2007 JP 2007277697**

**25.10.2007 JP 2007277747**

**26.10.2007 JP 2007279512**

**26.10.2007 JP 2007279580**

**30.09.2008 JP 2008254170**

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

**15.03.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OKANO, FUMIYOSHI y**  
**SUZUKI, KANA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 605 646 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**

Método para la detección de un cáncer

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método nuevo para la detección de un cáncer (o cánceres).

**Técnica anterior**

10 Los cánceres son la causa más común de muerte entre todas las causas de muerte, y las terapias principales para ellos son los tratamientos paliativos en los que el tratamiento quirúrgico se combina con la radioterapia y la quimioterapia. En virtud del avance en la tecnología médica, los cánceres se han convertido en enfermedades tales que pueden muy posiblemente curarse si se encuentran en una fase temprana. Por lo tanto, se demanda un método de detección del cáncer que se pueda llevar a cabo de forma fácil analizando suero, orina o similares, sin carga física y económica para los pacientes.

20 Recientemente, se han utilizado ampliamente como métodos diagnósticos métodos que utilizan sangre u orina, en los que se miden productos tumorales tales como marcadores tumorales. Los ejemplos de producto tumoral incluyen antígenos relacionados con tumor, enzimas, proteínas específicas, metabolitos, genes tumorales, productos de genes tumorales y genes supresores tumorales. En algunos cánceres se utilizan como marcadores tumorales en el diagnóstico del cáncer el antígeno carcinoembrionario ACE, las glucoproteínas CA19-9 y CA125, el antígeno prostático específico APE, la calcitonina, que es una hormona peptídica producida en la tiroides y similares. Sin embargo, en la mayoría de los tipos de cánceres no existen marcadores tumorales útiles para el diagnóstico del cáncer. Además, dado que la mayoría de los marcadores tumorales actualmente conocidos solo existen en muy pequeñas cantidades (por ejemplo, en el orden de pg/ml) en el fluido corporal, su detección requiere un método de medición elevadamente sensible o una técnica especial. En tales circunstancias, si se proporciona un método de prueba para el cáncer nuevo mediante el cual se puedan detectar diversos cánceres mediante operaciones simples, se espera que se desarrolle su uso para el diagnóstico de diversos cánceres.

30 El método sería muy útil si adicionalmente permite el diagnóstico de cánceres que se desarrollan en partes invisibles, la evaluación de la fase de la evolución del cáncer, la evaluación del grado de malignidad del cáncer, el seguimiento de los pacientes posquirúrgicos, el diagnóstico de reaparición, el diagnóstico de metástasis, el control de la terapia y similares, además de la detección de los cánceres.

35 De forma más particular, si se proporciona un método que permita el diagnóstico de cánceres que se desarrollan en partes invisibles, esto sería útil para la detección temprana de cánceres en partes donde los cánceres se detecten difícilmente, por ejemplo en el interior de la cavidad abdominal. Además, incluso en los casos en donde el tumor es demasiado pequeño para encontrarlo de forma visual, también se hace posible la detección de tales cánceres que no pueden encontrarse mediante ecografía, TC (tomografía computarizada) o RM (por resonancia magnética).

45 La fase de la evolución del cáncer se clasifica a base del alcance de la expansión del tumor en el sitio primario y si se ha producido o no metástasis en un ganglio linfático regional o en un órgano distante. En general, la fase de la enfermedad se clasifica en 5 fases, en las que un número grande indica un estado más avanzado. Sin embargo, estrictamente hablando, la definición varía dependiendo de los órganos, la fase 0 de la enfermedad indica un cáncer que se aloja en el epitelio y la fase IV indica un cáncer con metástasis a distancia. Si la fase de la evolución del cáncer se puede determinar como se describe anteriormente, se hace posible la determinación de una estrategia terapéutica apropiada y, además, la evaluación de los efectos terapéuticos de los fármacos antineoplásicos. Con respecto a la determinación de la estrategia terapéutica, por ejemplo, algunos cánceres de próstata son de baja malignidad y difícilmente evolucionan, por lo tanto no necesitan tratamiento; y otros son progresivos y producen metástasis en los huesos y/o similares, provocando dolor y la muerte de los pacientes. Dado que la hormonoterapia y la cirugía extirpativa están acompañadas de efectos secundarios, es necesario juzgar y determinar de forma apropiada la estrategia terapéutica. Además, si se puede juzgar de forma apropiada si el fármaco antineoplásico seleccionado es apropiado o no, cuando finalizar la administración del fármaco antineoplásico y similares, se puede reducir también la carga física y económica sobre el paciente. Por lo tanto, es importante que se pueda evaluar la fase de la evolución.

60 Una de las características de las células cancerosas es la blastogénesis, es decir la desdiferenciación. Excepto para una parte de los cánceres, las células cancerosas menos diferenciadas tales como las poco diferenciadas o las no diferenciadas, crecen de forma más rápida tras la metástasis y el pronóstico es malo. Se dice que tales cánceres que son elevadamente malignos. Por el contrario, las células cancerosas elevadamente diferenciadas, es decir, las que muestran un grado elevado de diferenciación celular, mantienen los rasgos estructurales y funcionales del órgano a partir del que se originaron, y se puede decir que son menos malignas. Si tal malignidad del cáncer se puede determinar, se hace posible asegurar un mayor margen de escisión del tumor en los casos en donde su malignidad es elevada aun cuando el tamaño del tumor sea pequeño, así como para dar seguimiento al paciente, prestado atención a áreas más grandes en los tejidos circundantes.

En los casos en donde es posible el diagnóstico de la evolución posquirúrgica, incluyendo reaparición y metástasis, se hace posible el diagnóstico de si el tumor se ha escindido de forma completa mediante la cirugía. Dado que es probable que se produzca reaparición en los casos en donde la escisión fue incompleta, esto puede utilizarse como una base para juzgar si es necesario un seguimiento más cuidadoso del paciente a intervalos cortos, y en algunos casos, para decidir si debería llevarse a cabo una cirugía temprana. Además, puede hallarse cáncer recurrente en su fase temprana con una elevada posibilidad. En el caso de las metástasis a distancia, su detección es probable que sea tardía, pero si se proporciona un método que permita el diagnóstico de la metástasis, se puede obtener una base para decidir si la región a vigilar debería extenderse además al sitio donde se extirpó el tumor y a la vecindad del mismo.

Si el control de la terapia es posible, para optimizar la terapia puede seleccionarse entre diversos métodos terapéuticos un método terapéutico apropiado o una combinación de métodos terapéuticos. Si se pueden observar los efectos terapéuticos de los agentes antineoplásicos, la selección de los períodos de dosificación y de los tipos y dosis de los agentes antineoplásicos puede hacerse de forma más fácil. Además, tras la escisión del tumor, se puede conocer la presencia/ausencia del tumor restante y, durante el seguimiento del paciente, se puede tener un indicio para encontrar metástasis o reaparición tan pronto como sea posible, de forma que sea posible el inicio del tratamiento temprano. Si es posible el control de un efecto terapéutico, puede determinarse si la estrategia terapéutica fue apropiada y si la estrategia terapéutica debería cambiarse por otra.

Se sabe que los perros envejecen 7 veces más rápido que los seres humanos. Hoy en día un animal de compañía se mantiene como un miembro de la familia y con frecuencia tiene un estilo de vida similar al de su dueño. Por lo tanto, si el animal de compañía padece cáncer, es posible predecir que el propietario tiene un elevado riesgo de desarrollar cáncer en el futuro. Si el diagnóstico preciso del cáncer en animales de compañía es posible, se espera que sea útil como un indicio para la profilaxis del cáncer en sus dueños.

Se dice que actualmente se tienen aproximadamente 6.390.000 perros en el Japón y aproximadamente 17.640.000 en los Estados Unidos. Desde que, además de la vacunación contra la rabia se han hecho populares las vacunas de combinación tales como las vacunas pentavalente, heptavalente y octavalente, la aparición de enfermedades infecciosas elevadamente letales tales como la infección por parvovirus canino, ha disminuido la infección por virus del moquillo canino, la parainfluenza canina (tos de las perreras), la infección por adenovirus canino de tipo II (tos de las perreras), la hepatitis infecciosa canina, la infección por coronavirus canino y la leptospirosis. Por lo tanto, la esperanza de vida promedio de los perros ha aumentado, y los perros de 7 años de edad o mayores representan el 35,5 % de la cantidad total de perros. Como causas de muerte están aumentando de forma consistente, como en el hombre, el cáncer, la hipertensión, las enfermedades cardíacas y similares. En los Estados Unidos se diagnostican con cáncer aproximadamente 4.000.000 de perros/año y también se dice que aproximadamente 1.600.000 perros en el Japón tienen de forma potencial un determinado tumor.

Sin embargo, no existen hasta ahora agentes de diagnóstico simples para los cánceres animales y, en el campo de la sanidad animal, no se utilizan de forma habitual los métodos de prueba tales como la fotografía mediante rayos X, la TC y la RM. Su diagnóstico se lleva a cabo mediante palpación, análisis de sangre simple y una prueba mediante radiografía, que depende en gran medida de la experiencia del veterinario. Aunque algunos veterinarios han comenzado a emplear un método de prueba utilizando suero, se utilizan en el método marcadores tumorales humanos dado que no se han encontrado aún marcadores tumorales caninos.

El diagnóstico preciso del cáncer requiere una intervención quirúrgica abdominal, y hay grandes problemas respecto a la carga física para un perro y la carga económica para su dueño. Si el diagnóstico de los cánceres se puede llevar a cabo de forma conveniente en animales de compañía tales como los perros y los gatos, se hace posible la detección temprana y el diagnóstico preciso de los cánceres, lo que es útil para el tratamiento de los cánceres en los animales de compañía. Además, si se proporciona un método que permita tal diagnóstico simple de los cánceres utilizando suero, se espera que el método no solo haga posible diagnosticar cánceres sino también que contribuya en gran medida al reconocimiento médico periódico, el diagnóstico prequirúrgico y la determinación de la estrategia terapéutica.

A diferencia de lo que sucede con los seres humanos, el examen médico no es popular en los animales de compañía. Por lo tanto, en muchos casos, un tumor en un animal de compañía se encuentra en una fase tardía, y el dueño se da cuenta del tumor y lleva a su animal al examen médico solo después de que el tumor se ha hecho más grande. En los casos en donde el tumor desarrollado es maligno, la terapia quirúrgica tal como la intervención quirúrgica y la administración de un agente antineoplásico, o similares, a menudo son muy tardías. Por lo tanto, en los casos en donde un veterinario determinó que el cáncer era maligno, en general la terapia farmacológica antineoplásica se lleva a cabo sin intervención quirúrgica. Incluso en los casos en donde se lleva a cabo una intervención quirúrgica, la intervención quirúrgica debe controlarse de forma estricta para asegurar el margen y evitar la dispersión de sangre y de células durante la operación. Es conveniente iniciar la terapia farmacológica antineoplásica inmediatamente después de la intervención quirúrgica y seguir al paciente a intervalos cortos. Se espera que la detección temprana de los cánceres se haga más fácil si se adopta el diagnóstico anteriormente descrito en el examen médico para la denominada caudectomía canina ("*dog dock*"), que últimamente se está popularizando.

Por otro lado, en el caso de un tumor benigno, se puede decidir llevar a cabo una intervención quirúrgica incluso si el tumor es grande. Todo lo que se necesita es cuidar el área extirpada, y no hay necesidad de tratamiento con ningún fármaco antineoplásico caro ni debe estar nervioso acerca del seguimiento.

- 5 A la vista de las circunstancias anteriormente descritas, si se proporciona un medio simple para la detección de los cánceres con una elevada sensibilidad que se pueda aplicar al diagnóstico del cáncer en animales, se hace posible una terapia precisa y eficaz, lo cual es elevadamente ventajoso tanto para los dueños como para los veterinarios.

- 10 Bibliografía no de patente 1: Investigación del Ministerio de salud, trabajo y bienestar, 2004  
 Bibliografía no de patente 2: Nikkei Science, marzo de 2007, pág. 80-88  
 Bibliografía no de patente 3: Clinical Tests, diciembre de 2003, vol. 47, n.º 13, p. 1641-1654  
 Bibliografía no de patente 4: Estadísticas sobre enfermedades de perros y gatos, enero de 2005  
 Bibliografía no de patente 5: Companion Animal Health Products: Edición de 2006 por Tim Wesley, ANIMAL PHARM REPORTS  
 15 Bibliografía no de patente 6: Expansión y fase de evolución del cáncer. Hideaki Tsukuma, Departamento de control y estadística del cáncer, Centro Medico de Osaka para el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.  
 Bibliografía no de patente 7: Proteins, Nucleic Acids and Enzymes, vol. 50, n.º 11, p. 1405-1412  
 Bibliografía no de patente 8: J Cell Sci. 115: 1825-35  
 Bibliografía no de patente 9: Blood. 95: 1788-96  
 20 Bibliografía no de patente 10: Mol Endocrinol. 9: 243-54 (1995)  
 Bibliografía no de patente 11: J Cell Biol. 145: 83-98 (1999)

### Divulgación de la invención

#### 25 Problemas a resolver mediante la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar medios para la detección de un cáncer (cánceres) que sea útil en el diagnóstico de un cáncer (cánceres).

#### 30 Medios para resolver el problema

Los presentes inventores investigaron de forma intensiva para obtener mediante el método SEREX un ADNc que codifica una proteína que se une a un anticuerpo que existe en suero obtenido de un cuerpo vivo portador de un tumor, utilizando una biblioteca de ADNc obtenida de testículo canino y suero de un perro portador de un tumor, cuyo ADN se utiliza para preparar un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, una proteína calmegina canina que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16, una proteína centrosómica canina (que puede abreviarse en lo sucesivo en este documento como CEP) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26 y la proteína de interacción con el receptor tiroideo 11 canina (que puede describirse en lo sucesivo en este documento como "TRIP11") que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 45. Además, a base de un gen humano homólogo al gen obtenido, se prepararon un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, una proteína calmegina humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18, una CEP humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 28 y una TRIP11 humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 47. Los inventores encontraron que los genes que codifican estas proteínas se expresan de forma específica en testículo canino y humano, y en células cancerosas malignas (véanse los Ejemplos A-1, B-1, C-1 y D-1), y que las proteínas recombinantes preparadas a base de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas reaccionan de forma específica con el suero en un cuerpo vivo portador de cáncer, así como que cada uno de los polipéptidos mencionados anteriormente y los factores homólogos de los mismos se pueden detectar de forma específica en un cuerpo vivo portador de cáncer mediante un anticuerpo preparado utilizando las respectivas proteínas recombinantes.

La presente invención proporciona un método como se define en las reivindicaciones para la detección de un cáncer (o cánceres), que se aplica a una muestra separada de un cuerpo vivo y que comprende medir una expresión de al menos un polipéptido producido en dicho cuerpo vivo y que tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4, mediante una reacción antígeno-anticuerpo.

La presente invención también proporciona el uso, como se define en las reivindicaciones, de un reactivo para la detección de un cáncer (cánceres), que comprende un polipéptido que reacciona de forma inmunológica con un anticuerpo inducido en un cuerpo vivo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4.

La presente invención proporciona adicionalmente el uso, como se define en las reivindicaciones, de un reactivo para la detección de un cáncer (o cánceres), que comprende un anticuerpo que reacciona de forma inmunológica con un polipéptido producido en un cuerpo vivo y que tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4, mediante una reacción

antígeno-anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo.

**Efectos de la invención**

5 Mediante la presente invención, se proporciona un método nuevo para la detección de un cáncer (o cánceres). Como se describirá de forma concreta en los Ejemplos a continuación, los polipéptidos recombinantes preparados a base de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4, la secuencia de aminoácidos de la calmegina, la secuencia de aminoácidos de la CEP mostrada en la SEQ ID NO: 26, 28 o 42, y la secuencia de aminoácidos de la TRIP11 reaccionan con anticuerpos que existen de forma específica en sueros de pacientes de  
 10 cáncer. Por lo tanto, los cánceres en un cuerpo vivo pueden detectarse midiendo el anticuerpo en una muestra de acuerdo con el método de la presente invención. Los cánceres en un cuerpo vivo también pueden detectarse midiendo la proteína antigénica *per se* que reconoce el anticuerpo. Debido a que el método de la presente invención hace posible detectar cánceres pequeños invisibles y cánceres que existen en una parte profunda de un cuerpo, también es útil para la detección temprana de cánceres en los exámenes médicos y similares. Si el método de la presente invención se utiliza en el seguimiento de los pacientes tras la terapia del cáncer, también se puede detectar la reaparición del cáncer en su etapa temprana. Además, el método de la presente invención hace posible evaluar la fase de la evolución del cáncer tal como el crecimiento del tumor, la invasión del tumor en los tejidos circundantes y la metástasis del cáncer en ganglios linfáticos y en órganos distantes. Además, el método de la presente invención hace posible evaluar el grado de la malignidad del cáncer, debido a que los pacientes que padecen un cáncer más  
 20 maligno tienen en suero más cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente, en comparación con los que padecen un cáncer menos maligno. Además, a base del aumento o disminución en suero del anticuerpo mencionado anteriormente, se puede evaluar qué tan eficaz es el fármaco antineoplásico administrado o si se dejó una porción del tumor en el paciente tras la extirpación del tumor, así como se puede obtener durante el seguimiento un indicio para encontrar metástasis y/o reaparición tan pronto como sea posible. Por lo tanto, mediante el método de la presente invención, se puede lograr el control de la terapia, lo que proporciona una base para la adopción de la estrategia terapéutica, tal como si la estrategia terapéutica aplicada a un paciente es apropiada o no, si la estrategia debe cambiarse a otra o no, o si una terapia debe iniciarse o no. Además, como se muestra en los Ejemplos a continuación, los ARNm que codifican un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 o 4, la calmegina, la CEP que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, 28 o  
 30 42, y los que codifican la TRIP11, se expresan de forma elevada de forma específica en el testículo y en células cancerosas. Por lo tanto, los cánceres se pueden detectar midiendo los ARNm.

**Breve descripción de los dibujos**

35 La Fig. 1 muestra el patrón de expresión del gen identificado en el Ejemplo A-1 en tejidos normales y en líneas celulares tumorales. Número de referencia 1: el patrón de expresión del gen identificado; número de referencia 2: el patrón de expresión del gen *GAPDH*.  
 La Fig. 2 muestra la detección mediante tinción de Coomassie de la proteína canina recombinante, que es un ejemplo del polipéptido utilizado en la presente invención, producida en *E. coli* y purificada en el Ejemplo A.  
 40 Número de referencia 3: la banda para la proteína canina recombinante.  
 La Fig. 3 muestra algunos de los resultados del diagnóstico del cáncer en perros portadores de cáncer, llevado a cabo utilizando la proteína canina recombinante preparada en el Ejemplo A.  
 La Fig. 4 muestra algunos de los resultados del diagnóstico de cáncer detallado en perros portadores de cáncer, llevado a cabo utilizando la proteína canina recombinante preparada en el Ejemplo A.  
 45 La Fig. 5 muestra el patrón de expresión del gen que codifica la proteína calmegina en tejidos normales y en líneas celulares tumorales. Número de referencia 1: el patrón de expresión del gen que codifica la proteína calmegina; número de referencia 2: el patrón de expresión del gen *GAPDH*.  
 La Fig. 6 muestra la detección por tinción de Coomassie de la calmegina canina, que es un ejemplo del polipéptido utilizado en la presente invención, producido en *E. coli* y purificado en el Ejemplo B. Número de referencia 3: la banda para la proteína calmegina canina.  
 50 La Fig. 7 muestra algunos de los resultados del diagnóstico del cáncer en perros portadores de cáncer, llevado a cabo utilizando la proteína calmegina canina preparada en el Ejemplo B.  
 La Fig. 8 muestra algunos de los resultados del diagnóstico del cáncer detallado en perros portadores de cáncer, llevado a cabo utilizando la proteína calmegina canina preparada en el Ejemplo B.  
 55 La Fig. 9 muestra el patrón de expresión del gen que codifica la CEP en tejidos normales y en líneas celulares tumorales. Número de referencia 1: el patrón de expresión para el gen que codifica la CEP; número de referencia 2: el patrón de expresión del gen *GAPDH*.  
 La Fig. 10 muestra la detección mediante tinción de Coomassie del polipéptido obtenido de la CEP canina, que es un ejemplo del polipéptido utilizado en la presente invención, producido en *E. coli* y purificado en el Ejemplo C. Número de referencia 3: la banda para el polipéptido obtenido de la CEP canina.  
 60 La Fig. 11 muestra algunos de los resultados del diagnóstico del cáncer en perros portadores de cáncer, llevado a cabo utilizando el polipéptido obtenido de la CEP canina preparada en el Ejemplo C.  
 La Fig. 12 muestra algunos de los resultados del diagnóstico de cáncer detallado en perros portadores de cáncer, llevado a cabo utilizando el polipéptido obtenido de la CEP canina preparada en el Ejemplo C.  
 65 La Fig. 13 muestra el patrón de expresión del gen que codifica la proteína TRIP 11 en tejidos normales y en líneas celulares tumorales. Número de referencia 1: el patrón de expresión del gen que codifica la proteína

TRIP11; número de referencia 2: el patrón de expresión del gen *GAPDH*.

La Fig. 14 muestra la detección mediante tinción de Coomassie del polipéptido obtenido de la TRIP 11 canina, que es un ejemplo del polipéptido utilizado en la presente invención, producido en *E. coli* y purificado en el Ejemplo D. Número de referencia 3: la banda del polipéptido obtenido de la TRIP 11 canina.

5 La Fig. 15 muestra algunos de los resultados del diagnóstico del cáncer en perros portadores de cáncer, llevado a cabo utilizando el polipéptido obtenido de la TRIP11 canina preparado en el Ejemplo D.

La Fig. 16 muestra algunos de los resultados del diagnóstico del cáncer detallado en perros portadores de cáncer, llevado a cabo utilizando el polipéptido obtenido de la TRIP11 canina preparado en el Ejemplo D.

## 10 Mejor modo para llevar a cabo la invención

En el método de la presente invención, la expresión de un polipéptido establecido se mide utilizando una muestra separada de un cuerpo vivo. El método para medir la expresión de un polipéptido utilizando la muestra incluye un método en el que se mide mediante inmunoensayo un anticuerpo frente al polipéptido, anticuerpo que está  
15 contenido en la muestra (Método 1); un método en que se mide mediante inmunoensayo el polipéptido *per se* contenido en la muestra (Método 2) y un método en que se mide el ARNm contenido en la muestra que codifica el polipéptido (Método 3). En el método de la presente invención, la expresión del polipéptido se puede medir por cualquiera de estos tres métodos. En la presente invención el término "medición" incluye la detección, cuantificación y semicuantificación.

20 El polipéptido establecido mencionado anteriormente, cuya expresión se mide (a) en el método de la presente invención está al menos (a) entre los polipéptidos (a) a (d) a continuación:

25 (a) un polipéptido producido en el cuerpo vivo y que tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4 mediante reacción antígeno-anticuerpo;

(b) la calmegina;

30 (c) un polipéptido que tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo frente a una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, 28 o 42 mediante reacción antígeno-anticuerpo;

(d) la proteína de interacción con el receptor tiroideo 11.

35 Como se muestra en los siguientes Ejemplos, los cánceres se detectan de forma satisfactoria incluso midiendo la expresión de solo uno de estos polipéptidos. Por lo tanto, en la presente invención, se puede medir la expresión de solo (a) entre los polipéptidos (a) a (d), así como se pueden medir dos o más de los polipéptidos (a) a (d) en combinación, siempre que se mida la expresión de (a). Los cánceres se pueden detectar con una precisión más elevada cuando se miden dos o más polipéptidos, (véase el Ejemplo E a continuación).

40 El polipéptido (a) es un polipéptido que se produce en un cuerpo vivo y tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4, mediante una reacción antígeno-anticuerpo. En otras palabras, el polipéptido establecido cuya expresión debe medirse es un polipéptido que tiene la misma antigenicidad que un polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2 o que un polipéptido obtenido de ser humano de la SEQ ID NO: 4.

45 Los ejemplos específicos de tal polipéptido incluyen un polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2 o un polipéptido obtenido de ser humano de la SEQ ID NO: 4. Estos polipéptidos son el antígeno correspondiente de "un anticuerpo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4" y por lo tanto incluidos en el polipéptido establecido mencionado anteriormente. Los ejemplos específicos del polipéptido también incluyen un polipéptido que se obtiene de otros mamíferos y que tiene la misma antigenicidad que el  
50 polipéptido obtenido de canino o de ser humano mencionado anteriormente (tal polipéptido se denominará en lo sucesivo en este documento como "factor homólogo", y el polipéptido obtenido de ser humano como se describe anteriormente también puede denominarse como "factor homólogo humano" del polipéptido obtenido de canino).

55 La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido con función desconocida identificado en los Ejemplos a continuación como un polipéptido que se une a un anticuerpo que existe de forma específica en suero obtenido de un perro portador de cáncer (el anticuerpo también puede denominarse en lo sucesivo en este documento como "anticuerpo específico de cáncer" de perros), cuya identificación se llevó a cabo mediante el método SEREX utilizando una biblioteca de ADNc obtenida de testículo canino y suero de perros portadores de cáncer (véase el Ejemplo A-1). Por lo tanto, en perros pueden detectarse los cánceres midiendo este anticuerpo  
60 específico de cáncer frente a un polipéptido de la SEQ ID NO: 2 en conformidad con el Método 1 anterior (véanse los Ejemplos A-3 y A-4). También se pueden detectar los cánceres en perros midiendo el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 *per se*, que es el antígeno, en conformidad con el Método 2 anterior (véanse los Ejemplos A-5 y A-6). Además, dado que la expresión del ARNm que codifica el polipéptido antigénico es significativamente elevada en el testículo y las células cancerosas, como se muestra en los siguientes Ejemplos (véase el Ejemplo A-1), en perros  
65 también pueden detectarse los cánceres midiendo el ARNm. Cabe señalar que, aunque la secuencia de aminoácidos del polipéptido canino mostrada en la SEQ ID NO: 2 está registrada en la base de datos del NCBI con

el n.º de Referencia XP\_535343 (proteína) y el n.º de Referencia XM\_535343 (gen codificante), su función no se ha informado aún.

La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos del factor homólogo humano del polipéptido obtenido de canino descrito anteriormente, el cual se encontró mediante búsqueda de homología mediante BLAST. La secuencia de bases que codifica el factor homólogo humano y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestran en las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, y también están registradas en la base de datos del NCBI con el n.º de Referencia NP\_689873 (proteína) y el n.º de Referencia NM\_152660 (gen codificante). De forma similar al polipéptido obtenido de canino descrito anteriormente, no se ha informado ninguna función del factor homólogo humano. Como se muestra de forma concreta en los siguientes Ejemplos, de forma similar al polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2, el nivel de expresión del ARNm que codifica el factor homólogo humano es significativamente elevado en testículo y células cancerosas humanas y en seres humanos sanos no se detecta un anticuerpo frente al factor homólogo humano. Por lo tanto, en los seres humanos pueden detectarse los cánceres determinando la expresión de un polipéptido de la SEQ ID NO: 4 en los seres humanos.

Los ejemplos específicos del factor homólogo en otros mamíferos que tienen la misma antigenicidad que el polipéptido obtenido de canino mencionado anteriormente o que el factor homólogo humano del mismo incluyen, por ejemplo, el polipéptido que existe de forma específica en gatos portadores de cáncer, como se muestra en los siguientes Ejemplos. El polipéptido felino reacciona de forma inmunológica no solo con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno el polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2 sino también con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno el factor homólogo humano de la SEQ ID NO: 4 (véanse los Ejemplos A-5 y A-6). Por lo tanto, este polipéptido felino es el factor homólogo felino que tiene la misma antigenicidad que los polipéptidos obtenidos de canino y de ser humano descritos anteriormente, e incluidos en el ámbito de un polipéptido "que tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4 mediante reacción antígeno-anticuerpo", cuya expresión se va a medir en la presente invención. Como se describe de forma concreta en los Ejemplos a continuación, un anticuerpo inducido en gatos frente al factor homólogo felino se detecta solo en gatos portadores de cáncer y no se detecta en gatos sanos. El factor homólogo felino *per se*, que es el antígeno, también se detecta solo en gatos portadores de cáncer y no se detecta en gatos sanos. Por lo tanto, se pueden detectar los cánceres en mamíferos midiendo la expresión del factor homólogo en mamíferos que no sean gatos y seres humanos.

El polipéptido (a) descrito anteriormente preferentemente es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, o un polipéptido que tiene una homología de no menos del 95 % con ella, y que se produce en un cuerpo vivo. La homología entre el polipéptido obtenido de canino (SEQ ID NO: 2) y el factor homólogo humano del mismo (SEQ ID NO: 4) es del 93 % en términos de secuencia de bases y del 99 % en términos de secuencia de aminoácidos. Aunque los perros y los seres humanos son genéticamente distantes, el factor homólogo en tales especies genéticamente distantes comparte una homología muy elevada del 99 % al nivel de aminoácidos. Por lo tanto, se cree que el factor homólogo en mamíferos que no sean el ser humano también comparte una homología elevada de no menos del 95 % con el polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2

El polipéptido anteriormente descrito (b), la Calmegina, se identificó como una proteína que se expresa de forma específica en el momento de la diferenciación de la espermátide, y tiene una actividad de chaperona *in vitro*. Dado que se expresa solo en testículo y desaparece en el espermatozoide maduro, la calmegina se considera que tiene la función de plegar proteínas implicadas en diferenciación de la espermátide (bibliografía no de patente 7: Naokazu Inoue, Ryo Yamaguchi y Masahito Ikawa, Protein, Nucleic Acid and Enzyme, vol. 50, n.º 11, 1405 - 1412). Sin embargo, no ha habido informes que muestren que la proteína se expresa en un cáncer y que sea útil para el diagnóstico del cáncer y similares.

La SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de la calmegina canina. La calmegina canina que tiene esta secuencia de aminoácidos se identificó como un polipéptido que se une a un anticuerpo que existe de forma específica en suero obtenido de un perro portador de cáncer, cuya identificación se llevó a cabo mediante el método SEREX utilizando una biblioteca de ADNc obtenido de testículo canino y suero de perros portadores de cáncer (véase el Ejemplo B-1). Es decir, en perros portadores de cáncer se induce de forma específica un anticuerpo frente a la calmegina que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16. Por lo tanto, en perros se pueden detectar cánceres midiendo el anticuerpo mencionado anteriormente frente a la calmegina que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16, en conformidad con el Método 1 anterior (véanse los Ejemplos B-3 y B-4). En perros también pueden detectarse cánceres midiendo la calmegina de la SEQ ID NO: 16 *per se*, que es el antígeno, en conformidad con el Método 2 anterior (véanse los Ejemplos B-5 y B-6). Además, dado que la expresión del ARNm que codifica la calmegina es significativamente elevada en testículo y en células cancerosas, como se muestra en los siguientes Ejemplos (véase el Ejemplo B-1), también pueden detectarse cánceres en perros midiendo el ARNm.

En el método de la presente invención puede medirse no solo calmegina canina de la SEQ ID NO: 16 sino también la calmegina en otros mamíferos (denominada en lo sucesivo en este documento como "factor homólogo" de la calmegina canina; en los casos en donde se utilice el término simple "calmegina", se denomina mediante este

término no solo a la calmegina canina sino también a la calmegina de otros mamíferos). Como se describe de forma concreta en el Ejemplo a continuación, de forma similar a la calmegina canina de la SEQ ID NO: 16, el nivel de expresión del ARNm que codifica la calmegina humana es también significativamente elevado en testículo y células cancerosas humanas, y no se detecta en humanos sanos un anticuerpo frente a la calmegina humana. El anticuerpo frente a la calmegina felina se detecta solo en gatos portadores de cáncer y no se detecta en gatos sanos. Por lo tanto, midiendo la expresión de la calmegina en mamíferos que no sean perros se pueden detectar también cánceres en los mamíferos. Además de la calmegina canina, los ejemplos de la calmegina a medir en el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, la calmegina humana, la calmegina felina y similares. La secuencia de bases que codifica la calmegina humana y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestran en las SEQ ID NO: 17 y 18 en el LISTADO DE SECUENCIAS, respectivamente, y la homología entre la calmegina humana y la calmegina canina es del 90 % en términos de la secuencia de bases y del 89 % en términos de la secuencia de aminoácidos. Aunque los perros y los seres humanos son genéticamente distantes, la calmegina en tales especies genéticamente distantes comparte una homología elevada del 89 % al nivel de aminoácidos. Por lo tanto, se cree que la calmegina en mamíferos que no sean seres humanos comparte una elevada homología de no menos de aproximadamente el 80 % con la calmegina canina. Es decir, la calmegina a medir en el método de la presente invención preferentemente tiene una homología de no menos del 80 %, más preferentemente no menos del 85 % con la calmegina canina mostrada en la SEQ ID NO: 16, aunque no se restringe a estos.

El polipéptido (c) descrito anteriormente es un polipéptido que tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo frente a la proteína centrosómica (CEP) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, 28 o 42, mediante reacción antígeno-anticuerpo. En otras palabras, el polipéptido (c) descrito anteriormente es un polipéptido que tiene la misma antigenicidad que la CEP obtenida de canino de la SEQ ID NO: 26 o 42 o la CEP obtenida de ser humano de la SEQ ID NO: 28.

Los ejemplos específicos de tal CEP establecida incluyen la CEP obtenida de canino de la SEQ ID NO: 26 o 42, y la CEP obtenida de ser humano de la SEQ ID NO: 28. Estas CEP son el antígeno correspondiente de "un anticuerpo frente a la CEP que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, 28 o 42", y por lo tanto están incluidas en una CEP establecida como se menciona anteriormente. Los ejemplos específicos de la CEP también incluyen la CEP obtenida de otros mamíferos que tiene la misma antigenicidad que la CEP obtenida de canino o de ser humano mencionada anteriormente (tal CEP se denomina en lo sucesivo en este documento como "factor homólogo" y una CEP obtenida de ser humano mencionada anteriormente también puede denominarse como "factor homólogo humano" de la CEP obtenida de canino).

La SEQ ID NO: 26 muestra la secuencia de aminoácidos de la CEP canina identificada como un polipéptido que se une a un anticuerpo que existe de forma específica en suero obtenido de un perro portador de cáncer (también denominado en lo sucesivo en este documento como "anticuerpo específico de cáncer" canino), cuya identificación se llevó a cabo mediante el método SEREX utilizando una biblioteca de ADNc obtenida de testículo canino y suero de perros portadores de cáncer (véase el Ejemplo C-1). Por lo tanto, en perros se pueden detectar los cánceres midiendo el anticuerpo mencionado anteriormente frente a la CEP canina que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, en conformidad con el Método 1 anterior (véanse los Ejemplos C-3 y C-4). También se pueden detectar los cánceres en perros midiendo la CEP de la SEQ ID NO: 26 *per se*, que es el antígeno, en conformidad con el Método 2 anterior (véanse los Ejemplos C-5 y C-6). Además, dado que la expresión del ARNm que codifica la CEP de la SEQ ID NO: 26 es significativamente elevada en testículo y las células cancerosas, como se muestra en los siguientes Ejemplos (véase el Ejemplo C-1), también pueden detectarse cánceres en perros midiendo el ARNm. La CEP es una proteína que el centrosoma necesita para controlar los microtúbulos y que también está implicada en la maduración del centrosoma. La frecuente aparición de translocaciones cromosómicas se conoce en una parte de los trastornos mieloproliferativos, y dado que el gen *CEP* está presente en el punto en donde se produce la translocación, se considera que tiene una determinada relación con los trastornos. Sin embargo, no ha habido informes que muestren que la proteína se exprese en un cáncer y sea útil para el diagnóstico del cáncer (bibliografía no de patente 8: J Cell Sci. 115: 1825-35, bibliografía no de patente 9: Blood 95: 1788-96).

La SEQ ID NO: 42 muestra la secuencia de aminoácidos de una CEP canina conocida registrada en una base de datos, que se encontró como una proteína que comparte una homología muy elevada con la CEP canina obtenida mediante la búsqueda por BLAST mencionada anteriormente (véase el Ejemplo C-1). La secuencia de bases de esta CEP canina conocida se muestra en la SEQ ID NO: 41. De forma similar a la CEP canina de la SEQ ID NO: 26, la CEP canina de la SEQ ID NO: 42 también se considera que se expresa de forma elevada en perros portadores de cáncer, y en perros los cánceres se pueden detectar determinando la expresión de esta CEP canina conocida, como se describe de forma concreta en los siguientes Ejemplos.

La SEQ ID NO: 28 muestra la secuencia de aminoácidos de un factor homólogo humano de la CEP obtenida de canino mencionado anteriormente, cuya secuencia de aminoácidos se encontró mediante búsqueda de homología por BLAST. La secuencia de bases que codifica el factor homólogo humano y la secuencia de aminoácidos del mismo, se muestra en las SEQ ID NO: 27 y 28 en el LISTADO DE SECUENCIAS, respectivamente. Como se describe de forma concreta en los Ejemplos a continuación, de forma similar a la CEP obtenida de canino de la SEQ ID NO: 26, el nivel de expresión del ARNm que codifica el factor homólogo humano es significativamente elevado en

testículo o células cancerosas humanos, y en seres humanos sanos no se detecta un anticuerpo frente al factor homólogo humano. Por lo tanto, en seres humanos pueden detectarse cánceres determinando la expresión de la CEP de la SEQ ID NO: 28 en los seres humanos.

5 Los ejemplos específicos del factor homólogo en otros mamíferos que tiene la misma antigenicidad que la CEP obtenida de canino descrita anteriormente o que el factor homólogo humano del mismo incluyen, por ejemplo, la CEP que existe de forma específica en gatos portadores de cáncer, como se muestra en los siguientes Ejemplos. La CEP felina reacciona de forma inmunológica no solo con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno la CEP obtenida de canino de la SEQ ID NO: 26 o 42, sino también con un anticuerpo preparado utilizando como  
10 inmunógeno el factor homólogo humano de la SEQ ID NO: 28 (véanse los Ejemplos C-5 y C-6). Por lo tanto, esta CEP felina es un factor homólogo felino que tiene la misma antigenicidad que las CEP obtenidas de canino y de ser humano mencionadas anteriormente, y por lo tanto están incluidas en el ámbito de una CEP “que tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo frente a la CEP que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, 28 o 42 mediante reacción antígeno-anticuerpo”, cuya expresión se medirá en la presente  
15 invención. Como se describe de forma completa en los Ejemplos a continuación, el anticuerpo inducido en gatos frente al factor homólogo felino se detecta solo en gatos portadores de cáncer y no se detecta en gatos sanos. El factor homólogo felino *per se*, que es el antígeno, también se detecta solo en gatos portadores de cáncer y no se detecta en gatos sanos. Por lo tanto, también se pueden detectar cánceres en mamíferos midiendo el factor homólogo en mamíferos que no sean perros y seres humanos.

20 Preferentemente, la CEP cuya expresión debe medirse en el método de detección de la presente invención es una CEP que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26 o 42 en el LISTADO DE SECUENCIA, o un polipéptido que tiene una homología de no menos del 80 % con el mismo y se produce en un cuerpo vivo. La homología entre la CEP obtenida de canino y el factor homólogo humano del mismo es del 87 % en términos de  
25 secuencia de bases y del 84 % en términos de secuencia de aminoácidos. Aunque los perros y los seres humanos son genéticamente distantes, el factor homólogo en tales especies genéticamente distantes comparte una homología muy elevada del 84 % a nivel de aminoácidos. Por lo tanto, se cree que el factor homólogo en mamíferos que no sean seres humanos también comparte una elevada homología de no menos del 80 % con la CEP canina.

30 El polipéptido descrito anteriormente (d), TRIP 11 (proteína que interacciona con el receptor tiroideo 11), se identificó primero como un factor que interactúa con el receptor de la hormona tiroidea  $\beta$  y también se hizo evidente su unión al aparato de Golgi y a los microtúbulos, de forma que se considera que desempeña un papel en el mantenimiento de las formas de estos orgánulos haciendo uniones entre los cisternas de Golgi, los microtúbulos y similares. Sin embargo, no ha habido informes que muestren que la proteína se exprese en un cáncer y sea útil para el diagnóstico del cáncer y similares (bibliografía no de patente 10: Mol Endocrinol 9: 243-54 (1995); bibliografía no de patente 11: J Cell Biol. 145: 83-98 (1999)).

La SEQ ID NO: 45 muestra la secuencia de aminoácidos del TRIP11 canino. El TRIP11 canino que tiene esta secuencia de aminoácidos se identificó como polipéptido que se une a un anticuerpo que existe de forma específica  
40 en suero obtenido de un perro portador de cáncer, cuya identificación se llevó a cabo mediante el método SEREX utilizando una biblioteca de ADNc obtenida de testículo canino y suero de perros portadores de cáncer (véase el Ejemplo D-1). Es decir, en perros portadores de cáncer, se induce de forma específica un anticuerpo frente al TRIP11 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 45. Por lo tanto, en perros se pueden detectar cánceres midiendo el anticuerpo mencionado anteriormente frente al TRIP 11 que tenga la secuencia de  
45 aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 45, en conformidad con el Método 1 anterior (véanse los Ejemplos D-3 y D-4). También se pueden detectar cánceres en perros midiendo el TRIP11 de la SEQ ID NO: 45 *per se*, que es el antígeno, en conformidad con el Método 2 anterior (véanse los Ejemplos D-5 y D-6). Además, dado que la expresión del ARNm que codifica al TRIP 11 es significativamente elevada en el testículo y en células cancerosas, como se muestra en los Ejemplos siguientes (véase el Ejemplo D-1), también pueden detectarse cánceres en perros  
50 midiendo el ARNm.

En el método de la presente invención, puede medirse no solo el TRIP11 canino de la SEQ ID NO: 45 sino también el TRIP 11 de otros mamíferos (también denominado en lo sucesivo en este documento como “factor homólogo” del TRIP11 canino; en los casos en donde se utilice el término simple “TRIP11”, se denomina mediante el término no  
55 solo el TRIP11 canino sino también otros TRIP11 de mamífero). Como se describe de forma concreta en el Ejemplo a continuación, de forma similar al TRIP11 canino de la SEQ ID NO: 45, el nivel de expresión del ARNm que codifica el TRIP11 humano también es significativamente elevado en el testículo y células cancerosas humanas, y no se detecta en humanos sanos un anticuerpo frente al TRIP11 humano. El anticuerpo frente al TRIP11 felino se detecta solo en gatos portadores de cáncer y no se detectan en gatos sanos. Por lo tanto, también pueden detectarse  
60 cánceres en los mamíferos midiendo la expresión del TRIP11 en mamíferos que no sean perros. Además del TRIP 11 canino, los ejemplos del TRIP11 a medir en el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, TRIP11 humano, TRIP11 felino y similares. La secuencia de bases que codifican el TRIP11 humano y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestran en las SEQ ID NO: 46 y 47 en el LISTADO DE SECUENCIAS, respectivamente, y la homología entre el TRIP11 canino y el TRIP11 humano es del 88 % en términos de la  
65 secuencia de bases y del 86 % en términos de la secuencia de aminoácidos. Aunque los perros y los seres humanos son genéticamente distantes, los TRIP11 en tales especies genéticamente distantes comparten entre sí una

homología muy elevada del 86 % al nivel de aminoácidos. Por lo tanto, se cree que el TRIP11 en mamíferos que no sean seres humanos también comparte una homología elevada de no menos de aproximadamente el 75 % con el TRIP11 canino. Es decir, el TRIP11 cuya expresión debe medirse en el método de la presente invención preferentemente tiene una homología de no menos del 75 %, más preferentemente no menos del 80 % con la secuencia de aminoácidos del TRIP11 canino mostrada en la SEQ ID NO: 45, aunque no se restringe a estos.

Cabe señalar que la expresión “que tiene la secuencia de aminoácidos” en la presente invención significa que los restos de aminoácidos se alinean en ese orden. Por consiguiente, por ejemplo “un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2” significa un polipéptido que tiene un tamaño de 306 restos de aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos es Met Ala Ala Leu ... (...)... Ile Thr Ser Pro como se muestra en la SEQ ID NO: 2. Además, “un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2” puede abreviarse como “un polipéptido de la SEQ ID NO: 2”. Esto también se aplica a la expresión “que tenga la secuencia de bases”. Cabe señalar que el término “polipéptido” en la presente invención significa una molécula formada por el enlace peptídico de una pluralidad de aminoácidos, e incluye no sólo moléculas de polipéptido constituidas por un gran número de aminoácidos, sino también moléculas de bajo peso molecular que tengan un pequeño número de aminoácidos (oligopéptidos) y proteínas de longitud completa. Por lo tanto, en la presente invención también están incluidas en “polipéptido” las proteínas que consisten en la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, 4, 16, 18, 26, 28, 42, 45 o 47.

En el Método 1 anterior, la medición del anticuerpo específico de cáncer que puede existir en la muestra, se puede llevar a cabo de forma fácil mediante inmunoensayo utilizando una sustancia antigénica que reacciona de forma inmunológica con el anticuerpo. El inmunoensayo *per se* es un método convencional bien conocido, como se explica con detalle a continuación. Los ejemplos de la sustancia antigénica que puede utilizarse en el inmunoensayo incluyen un polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, que induce el anticuerpo en perros portadores de cáncer. Dado que los anticuerpos tienen reactividad cruzada, una molécula puede unirse a un anticuerpo que se induce frente a otro inmunógeno, siempre que la molécula tenga alguna estructura en ella que sea similar al epítipo del inmunógeno. Por ejemplo, los polipéptidos que tienen entre sí elevada homología de secuencia de aminoácidos, a menudo tienen epítopos con estructuras similares, y en tales casos ambos polipéptidos pueden tener la misma antigenicidad. Como se describe de forma concreta en los Ejemplos a continuación, el polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45 reacciona de forma inmunológica no solo con un anticuerpo frente al polipéptido inducido en perros portadores de cáncer, sino también con un anticuerpo inducido frente a un factor homólogo felino en gatos portadores de cáncer. El factor homólogo humano reacciona de forma inmunológica con los anticuerpos descritos anteriormente inducidos en gatos y perros portadores de cáncer. Por lo tanto, en el Método 1 de la presente invención, en el inmunoensayo puede utilizarse como antígeno cualquiera de los factores homólogos de mamífero.

Las sustancias antigénicas que tienen un gran peso molecular y una estructura compleja, tales como las proteínas, habitualmente tienen una pluralidad de sitios con distintas estructuras en su superficie. Por lo tanto, tal sustancia antigénica compleja grande induce en un cuerpo vivo una pluralidad de tipos de anticuerpos que reconocen respectivamente cada uno de los sitios. Es decir, un anticuerpo inducido en un cuerpo vivo frente a una sustancia antigénica tal como una proteína es un anticuerpo policlonal, que es una mezcla de una pluralidad de tipos de anticuerpos. Los anticuerpos específicos de cáncer que encontraron los presentes inventores, que existen de forma específica en el suero procedente de cuerpos vivos portadores de cáncer, y que se unen de forma específica a un polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o factores homólogos de los mismos, mediante reacción antígeno-anticuerpo, también son un anticuerpo policlonal. Cabe señalar que, en la presente invención, la expresión “anticuerpo policlonal” significa un anticuerpo que existe en el suero procedente de un cuerpo vivo que tiene una sustancia antigénica en él y que se induce en el cuerpo vivo frente a la sustancia antigénica.

En el Ejemplo A a continuación, se prepararon como un antígeno para el inmunoensayo del anticuerpo específico de cáncer, el polipéptido que consiste en la región entera de la SEQ ID NO: 2 y un polipéptido que consiste en la región entera de la SEQ ID NO: 4, que es el factor homólogo humano, y se confirmó la reactividad de estos polipéptidos con el anticuerpo en el suero obtenido de un cuerpo vivo portador de cáncer. En el Ejemplo B a continuación, se prepararon un polipéptido que consiste en la región entera de la SEQ ID NO: 16 (calmegina canina) y un polipéptido que consiste en la región entera de la SEQ ID NO: 18 (calmegina humana), que es el factor homólogo humano del mismo, y se confirmó la reactividad de estos polipéptidos con el anticuerpo en el suero obtenido de un cuerpo vivo portador de cáncer. En el Ejemplo C a continuación, se prepararon un polipéptido que consiste en una región de los aminoácidos 1514 a 2339 de la SEQ ID NO: 26 (CEP canino) y un polipéptido que consiste en una región de los aminoácidos 1513 a 2325 de la SEQ ID NO: 28 (CEP humano), y se confirmó la reactividad de estos polipéptidos con el anticuerpo en el suero obtenido de un cuerpo vivo portador de cáncer. En el Ejemplo D a continuación, se prepararon un polipéptido que consiste en una región de los aminoácidos 237 a 1023 de la SEQ ID NO: 45 (TRIP11 canino) y un polipéptido que consiste en una región de los aminoácidos 236 a 1023 de la SEQ ID NO: 47 (TRIP11 humano), y se confirmó la reactividad de estos polipéptidos con el anticuerpo en el suero obtenido de un cuerpo vivo portador de cáncer. Sin embargo, dado que los anticuerpos mencionados anteriormente son policlonales, un polipéptido que consiste en la longitud completa de las SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45 o un factor homólogo del mismo, por supuesto se une al anticuerpo. Además, un fragmento del polipéptido se puede unir al anticuerpo contenido en el suero procedente de un cuerpo vivo portador de cáncer, dado que el anticuerpo policlonal puede

incluir anticuerpos que reconocen la estructura del fragmento. Es decir, en la medición del anticuerpo policlonal contenido de forma específica en el suero de un cuerpo vivo portador de cáncer, se puede utilizar no solo un polipéptido que consiste en la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o un factor homólogo del mismo, sino también un fragmento del mismo, y es útil para la detección de un cáncer (o cánceres).

5 Por lo tanto, un polipéptido utilizado como un antígeno para el inmunoensayo del Método 1 de la presente invención no se restringe a un polipéptido que consiste en la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o a un factor homólogo del mismo (por ejemplo la SEQ ID NO: 4, 18, 28, 47, etc.), e incluye un fragmento de polipéptido que consiste en no menos de 7 aminoácidos consecutivos, preferentemente no menos de 10 aminoácidos  
10 consecutivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o de un factor homólogo del mismo, y que reacciona de forma inmunológica con un anticuerpo policlonal frente a un polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o un factor homólogo del mismo (el fragmento de polipéptido también se puede denominar en lo sucesivo en este documento como "polipéptido parcial reactivo de forma específica" según conveniencia). Cabe señalar que, como se conoce en la técnica, un polipéptido que tenga  
15 no menos de aproximadamente 7 restos de aminoácidos puede ejercer su antigenicidad.

Sin embargo, en los casos donde el número de restos de aminoácidos sea demasiado pequeño, está aumentada la posibilidad de que el polipéptido antigénico pueda reaccionar de forma cruzada con anticuerpos frente a proteínas que existen en la muestra y sean distintas del polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o el factor homólogo del mismo. Por lo tanto, a la vista de lograr una alta precisión en el inmunoensayo, es preferente como el antígeno utilizado en el inmunoensayo un fragmento de polipéptido que consiste en un gran número de restos de aminoácidos. Por ejemplo, en el caso de un polipéptido de la SEQ ID NO: 2, o un factor homólogo del mismo, se desea que el número de restos de aminoácidos del fragmento de polipéptido utilizado deba ser preferentemente de no menos de 30, más preferentemente de no menos de 100, aún más preferentemente de no menos de 200, aún más preferentemente de no menos de 250. En el caso de la calmegina canina de la SEQ ID NO: 16, o un factor homólogo de la misma, se desea que el número de restos de aminoácidos deba ser preferentemente de no menos de 30, más preferentemente de no menos de 100, aún más preferentemente de no menos de 200, aún más preferentemente de no menos de 400, aún más preferentemente de no menos de 550. En el caso del CEP canino de la SEQ ID NO: 26 o 42, o de un factor homólogo del mismo, se desea que el número de restos de aminoácidos deba ser preferentemente de no menos de 30, más preferentemente de no menos de 100, aún más preferentemente de no menos de 300, aún más preferentemente de no menos de 600, y el número de restos de aminoácidos puede ser de no menos de 1000, no menos de 1500 o no menos de 2000. En el caso del TRIP11 canino de la SEQ ID NO: 45, o de un factor homólogo del mismo, se desea que el número del resto de aminoácidos deba ser preferentemente de no menos de 30, más preferentemente de no menos de 100, aún más preferentemente de no menos de 300, aún más preferentemente de no menos de 600, y el número de restos puede ser de no menos de 1000 o no menos de 1500.

Los ejemplos específicos del polipéptido utilizado como un antígeno incluyen los siguientes polipéptidos:

- 40 (e) un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4;
- (f) un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16 o 18;
- (g) un polipéptido que consiste en no menos de 500 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26 y que comprende no menos de 500 aminoácidos consecutivos emplazados en la región de los aminoácidos 1514 a 2339 de la SEQ ID NO: 26, o un polipéptido que consiste en no menos de 500 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 28 y que comprende no menos de 500 aminoácidos consecutivos emplazados en la región de los aminoácidos 1513 a 2325 de la SEQ ID NO: 28;
- 45 (h) un polipéptido que consiste en no menos de 500 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 45 y que comprende no menos de 500 aminoácidos consecutivos emplazados en la región de los aminoácidos 237 a 1023 de la SEQ ID NO: 45, o un polipéptido que consiste en no menos de 500 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 47 y que comprende no menos de 500 aminoácidos consecutivos emplazados en la región de los aminoácidos 236 a 1023 de la SEQ ID NO: 47.

55 Los ejemplos preferentes del polipéptido (g) anterior (un polipéptido de la SEQ ID NO: 26 o un fragmento del mismo, o un polipéptido de la SEQ ID NO: 28 o un fragmento del mismo) incluyen un fragmento que comprende una región de los aminoácidos 1514 a 2339 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26 y consiste en no más de 1000 aminoácidos, y un fragmento que comprende una región de los aminoácidos 1513 a 2325 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 28 y que consiste en no más de 1000 aminoácidos. Los ejemplos más preferentes de los mismos incluyen un fragmento que consiste en una región de los aminoácidos 1514 a 2339 (SEQ ID NO: 35) de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, y un fragmento que consiste en una región de los aminoácidos 1513 a 2325 (SEQ ID NO: 36) de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 28.

65 Los ejemplos preferentes del polipéptido (h) anterior (un polipéptido de la SEQ ID NO: 45 o un fragmento del mismo, o un polipéptido de la SEQ ID NO: 47 o un fragmento del mismo) incluyen un fragmento que comprende una región

de los aminoácidos 237 a 1023 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 45 y consiste en no menos de 1000 aminoácidos, y un fragmento que comprende una región de los aminoácidos 236 a 1023 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 47 y consiste en no más de 1000 aminoácidos. Los ejemplos más preferentes del mismo incluyen un fragmento que consiste en una región de los aminoácidos 237 a 1023 (SEQ ID NO: 54) de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 45, y un fragmento que consiste en una región de los aminoácidos 236 a 1023 (SEQ ID NO: 55) de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 47.

Se sabe bien en la técnica que, en general, hay casos en donde un antígeno de proteína conserva sustancialmente la misma antigenicidad que el original incluso si la secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica de forma que se sustituye, deleciona y/o inserta un pequeño número de aminoácidos. Por lo tanto, también puede utilizarse para la detección de los cánceres cada uno de los polipéptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o que el factor homólogo del mismo, excepto que esté sustituido, delecionado y/o insertado un pequeño número de aminoácidos, cuya secuencia tiene una homología de no menos del 80 %, preferentemente no menos del 90 %, más preferentemente no menos del 95 %, aún más preferentemente no menos del 98 % con la secuencia del polipéptido original, y cuyo polipéptido se une de forma específica a un anticuerpo policlonal frente a un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o a un factor homólogo del mismo, mediante reacción antígeno-anticuerpo (los polipéptidos también pueden denominarse en lo sucesivo en este documento como "polipéptido modificado reactivo de forma específica" para conveniencia). Preferentemente, el polipéptido modificado reactivo de forma específica tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o que un factor homólogo del mismo (preferentemente que tenga la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4, 18, 28 o 47), excepto que estén sustituidos, delecionados y/o insertados uno o varios restos de aminoácido.

Como se utiliza en el presente documento, el término "homología" de secuencias de aminoácidos significa un valor expresado en porcentaje que se calcula alineando dos secuencias de aminoácidos a comparar, de forma que el número de restos de aminoácidos que coinciden sea máximo y dividiendo el número de restos de aminoácidos que coinciden por el número total de restos de aminoácidos. Cuando el alineamiento descrito anteriormente se lleva a cabo, se inserta (o insertan) un hueco (o huecos) según se necesite en una o ambas de las dos secuencias a comparar. Tal alineamiento de secuencias se puede llevar a cabo utilizando un programa bien conocido tal como BLAST, FASTA y CLUSTAL W. Cuando se inserta (o insertan) un hueco (o huecos), el número total de restos de aminoácidos descrito anteriormente se calcula contando un hueco como un resto de aminoácidos. Cuando los así contados números de restos de aminoácidos totales son distintos entre las dos secuencias a comparar, la homología (%) se calcula dividiendo el número de restos de aminoácido que coinciden por el número total de restos de aminoácidos en la secuencia más larga. Los 20 tipos de aminoácidos que constituyen las proteínas de origen natural se pueden clasificar en grupos, cada uno de los cuales tiene propiedades similares, por ejemplo, en aminoácidos neutros con cadenas laterales que tienen baja polaridad (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro), aminoácidos neutros que tienen cadenas laterales hidrófilas (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys), aminoácidos ácidos (Asp, Glu), aminoácidos básicos (Arg, Lys, His) y aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp). Se sabe que, en la mayoría de los casos, las sustituciones de aminoácidos dentro del mismo grupo no cambian las propiedades de los polipéptidos. Por lo tanto, en los casos en donde el resto (o restos) de aminoácido del polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o de un factor homólogo del mismo, se sustituya (o sustituyan), la probabilidad de que la capacidad de unión al correspondiente anticuerpo puede mantenerse puede hacerse más alta realizando la sustitución (o sustituciones) dentro del mismo grupo.

También pueden utilizarse para la detección de los cánceres los polipéptidos que contienen el polipéptido descrito anteriormente utilizado en la presente invención como una secuencia parcial (es decir, los polipéptidos utilizados en la presente invención que tienen otro (poli)péptido (o polipéptidos) añadido en uno o ambos extremos del mismo) y que se unen de forma específica a un anticuerpo policlonal frente a un polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o a un factor homólogo del mismo (los polipéptidos también pueden denominarse en lo sucesivo en este documento como "polipéptido añadido reactivo de forma específica" para conveniencia).

Los polipéptidos descritos anteriormente utilizados en la presente invención pueden prepararse mediante síntesis química, tal como el método de Fmoc (método del fluorenilmetiloxycarbonilo), el método tBoc (método del *t*-butiloxycarbonilo) o similar, o prepararse mediante un método convencional utilizando un sintetizador de péptidos disponible de forma comercial. Además, los polipéptidos pueden prepararse fácilmente mediante un método de ingeniería genética conocido. Por ejemplo, los polipéptidos deseados pueden obtenerse extrayendo los ARN de un tejido que expresa un gen que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o un factor homólogo del mismo, preparando ADNc del gen mediante RT-PCR, insertando la longitud completa o una parte deseada del ADNc en un vector de expresión, y después introduciendo el vector en una célula hospedadora. Las secuencias de bases de los ADNc que codifican el polipéptido canino de la SEQ ID NO: 2, la calmegina canina de la SEQ ID NO: 16, los CEP caninos de las SEQ ID NO: 26 y 42, y el TRIP11 canino de la SEQ ID NO: 45, se muestran en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 15, las SEQ ID NO: 25 y 41, y la SEQ ID NO: 44, respectivamente, y las secuencias de bases de los ADNc que codifican los factores homólogos humanos de los polipéptidos anteriores se muestran en la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 17 (calmegina humana), la SEQ ID NO: 27 (el CEP humano) y la SEQ ID NO: 47 (el TRIP11 humano), respectivamente. Por lo tanto, en referencia a estas secuencias de bases, los cebadores utilizados en la

- RT-PCR pueden diseñarse de forma fácil. Además, como se explica a continuación, los genes que codifican un factor homólogo en mamíferos que no sean un ser humano, pueden amplificarse utilizando cebadores diseñados en referencia a las secuencias de bases de los polipéptidos caninos y a los factores homólogos humanos. Por lo tanto, los ADNc que codifican por ejemplo un factor homólogo felino pueden prepararse fácilmente de la misma manera que se describe anteriormente. La extracción de los ARN, la RT-PCR, la inserción del ADNc en un vector y la introducción de un vector en una célula hospedadora, pueden realizarse mediante un método bien conocido como se describe a continuación. Los vectores y las células hospedadoras que pueden utilizarse son bien conocidos, y están disponibles de forma comercial diversos vectores y células hospedadoras.
- Las células hospedadoras descritas anteriormente no están restringidas siempre que puedan expresar el polipéptido descrito anteriormente, y los ejemplos de las mismas incluyen células procariotas tales como *E. coli*; y células eucariotas tales como células cultivadas de mamífero que incluyen células de riñón de mono COS 1 y células de ovario de hámster Chino CHO, levaduras de gemación, levadura de fisión, células del gusano de seda y oocitos de *Xenopus laevis*.
- En los casos en que se utilizan como células hospedadoras células procariotas, se utiliza como el vector de expresión un vector de expresión que tenga el origen que permita su replicación en una célula procariota, un promotor, un sitio de unión al ribosoma, un sitio de clonación de ADN, un terminador y similares. Los ejemplos del vector de expresión para *E. coli* incluyen el sistema pUC, pBluescriptII, el sistema de expresión pET y el sistema de expresión pGEX. Incorporando el ADN que codifica el polipéptido descrito anteriormente en tal vector de expresión y transformando células hospedadoras procariotas con el vector, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos, se puede expresar el polipéptido que codifica el ADN descrito anteriormente en células procariotas. En este caso, el polipéptido también puede expresarse como una proteína de fusión con otra proteína. El ADN que codifica el polipéptido descrito anteriormente puede obtenerse preparando ADNc mediante RT-PCR, como se describe anteriormente, o puede sintetizarse mediante un método convencional utilizando un sintetizador de ácidos nucleicos disponible de forma comercial como se explica a continuación. Cabe señalar que las secuencias de bases de los ADNc que codifican los polipéptidos de las SEQ ID NO: 2, 4, 16, 18, 26, 28, 42, 45 y 47 se muestran en las SEQ ID NO: 1, 3, 15, 17, 25, 27, 41, 44 y 46 en el LISTADO DE SECUENCIAS, respectivamente.
- En los casos en donde se utilizan como células hospedadoras células eucariotas, se utiliza como el vector de expresión un vector de expresión para células eucariotas que tenga un promotor, un sitio de corte y empalme, un sitio de adición de poli(A) y similares. Los ejemplos de tal vector de expresión incluyen pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, el vector EBV, pRS, pcDNA3, pMSG y pYES2. De la misma manera que se describe anteriormente, incorporando el ADN que codifica el polipéptido utilizado en la presente invención en tal vector de expresión y transformando células hospedadoras eucariotas con el vector, seguido del cultivo del transformante obtenido, se puede expresar en las células hospedadoras eucariotas el polipéptido que codifica el ADN descrito anteriormente. En los casos en donde se utilizó como vector de expresión pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1 o pEGFP-C1, se puede expresar el polipéptido descrito anteriormente como una proteína de fusión que tenga diversas etiquetas añadidas tales como la etiqueta His, la etiqueta FLAG, la etiqueta myc, la etiqueta HA o la GFP.
- La introducción del vector de expresión en las células hospedadoras se puede llevar a cabo utilizando un método bien conocido tal como electroporación, el método de fosfato de calcio, el método de liposomas o el método de DEAE dextrano.
- El aislamiento y la purificación de un polipéptido de interés a partir de las células hospedadoras se pueden llevar a cabo mediante una combinación de operaciones de separación conocidas. Los ejemplos de las operaciones incluyen el tratamiento mediante un desnaturalizante tal como urea o mediante un tensioactivo; el tratamiento por ultrasonidos; la digestión enzimática; la desalación y la precipitación fraccional con disolventes; la diálisis; la centrifugación; la ultrafiltración; la filtración por gel; SDS-PAGE; el isoelectroenfoque; la cromatografía de intercambio iónico; la cromatografía hidrófoba; la cromatografía de afinidad y la cromatografía en fase inversa.
- Los polipéptidos obtenidos mediante el método anterior incluyen aquellos en la forma de una proteína de fusión con otra proteína arbitraria. Los ejemplos de los mismos incluyen proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST) y con una etiqueta His. Tal polipéptido en forma de una proteína de fusión también está incluido en el polipéptido reactivo de forma específica añadido descrito anteriormente, y puede utilizarse en el Método 1 de la presente invención. Además, en algunos casos, un polipéptido expresado en una célula transformada se modifica en la célula de diversos modos, tras la traducción del mismo. Tal polipéptido que tiene una modificación postraducciona también puede utilizarse en el Método 1 de la presente invención, siempre que tenga la capacidad de unirse a un anticuerpo policlonal frente a un polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o 4. Los ejemplos de tal modificación postraducciona incluyen la eliminación de la metionina del extremo N, la acetilación del extremo N, la glucosilación, la degradación limitada mediante una proteasa intracelular, la miristoilación, la isoprenilación y la fosforilación.
- La medición del anticuerpo en una muestra se puede llevar a cabo de forma fácil mediante inmunoensayo, utilizando como antígeno el polipéptido descrito anteriormente. Los inmunoensayos *per se* son bien conocidos en la técnica, e incluyen, cuando se clasifican a base del modo de reacción, el método de tipo sándwich, el método de competición,

el método de aglutinación, el método por transferencia de Western y similares. Cuando se clasifican basándose en el marcador, los inmunoensayos incluyen el radioinmunoensayo, el inmunoensayo de fluorescencia, el inmunoensayo enzimático, inmunoensayo de biotina y similares, y el inmunoensayo del anticuerpo descrito anteriormente se puede llevar a cabo mediante cualquiera de estos inmunoensayos. Aunque no está restringido, pueden utilizarse preferentemente como un inmunoensayo del anticuerpo anterior en la presente invención el ELISA de tipo sándwich y el método de competición, dado que estos métodos son simples y no necesitan aparatos a gran escala. En los casos en donde se utilizan enzimas como un marcador de anticuerpos, la enzima utilizada no está restringida de forma particular, siempre que satisfaga condiciones tales como que el número de renovación sea grande, que la enzima sea estable incluso cuando esté unida a un anticuerpo, que coloree de forma específica su sustrato y similares. Por ejemplo, se pueden utilizar las enzimas utilizadas en un inmunoensayo enzimático ordinario tales como la peroxidasa, la  $\beta$ -galactosidasa, la fosfatasa alcalina, la glucosa oxidasa, la acetilcolinesterasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa. También pueden utilizarse inhibidores enzimáticos, coenzimas y similares. La unión de estas enzimas con un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante un método conocido utilizando un agente de entrecruzamiento, tal como un compuesto de maleimida. Como sustrato, pueden utilizarse sustancias conocidas que dependen del tipo de enzima utilizada. Por ejemplo, en los casos en donde se utilice como la enzima la peroxidasa, se puede utilizar 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y en los casos en donde se utilice como la enzima la fosfatasa alcalina, puede utilizarse paranitrofenol, o similares. Como radioisótopo, pueden utilizarse los utilizados en un radioinmunoensayo ordinario, tales como  $^{125}\text{I}$  y  $^3\text{H}$ . Como colorante fluorescente, puede utilizarse uno utilizado en una técnica de anticuerpos fluorescente ordinaria, tal como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), el isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) o similar.

Estos inmunoensayos *per se* son bien conocidos en la técnica y, de tal modo, no es necesario explicarlos en la presente memoria descriptiva. Brevemente, en los inmunoensayos de tipo sándwich, por ejemplo, el polipéptido mencionado anteriormente utilizado como antígeno se inmoviliza en una fase sólida y después se hace reaccionar con una muestra tal como un suero. Tras el lavado de la fase sólida, el resultante se hace reaccionar con un anticuerpo secundario apropiado. Tras el lavado de la fase sólida se mide el anticuerpo secundario unido a la fase sólida. En el método para la detección de un cáncer (o cánceres) de acuerdo con la presente invención, es preferente inmovilizar un polipéptido antigénico en una fase sólida, debido a que la inmovilización en una fase sólida hace posible retirar de forma fácil el anticuerpo secundario no unido. Como el anticuerpo secundario, por ejemplo, en los casos en donde la muestra se obtenga a partir de perros puede utilizarse anticuerpo anti IgG de perro. El anticuerpo secundario unido a una fase sólida puede medirse mediante el marcaje del anticuerpo secundario con una sustancia marcadora ejemplificada anteriormente. La cantidad así medida del anticuerpo secundario corresponde a la cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente en una muestra de suero. En los casos en donde se utilice una enzima como sustancia marcadora, la cantidad del anticuerpo se puede medir añadiendo un sustrato que se descompone mediante la actividad enzimática para desarrollar un color, y después midiendo de forma óptica la cantidad de sustrato descompuesto. En los casos en donde se utiliza un radioisótopo como una sustancia marcadora, puede medirse la cantidad de radiación procedente del radioisótopo con un contador de centelleo o similar.

En el Método 2 de la presente invención se mide al menos un polipéptido que puede estar contenido en una muestra obtenida de un cuerpo vivo, seleccionado del grupo que consiste en el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un factor homólogo del mismo, la calmegina, el CEP de la SEQ ID NO: 26 o 42 o un factor homólogo del mismo, y el TRIP11. Como se explica anteriormente, la abundancia del anticuerpo específico de cáncer que reacciona de forma inmunológica con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un factor homólogo del mismo, la calmegina en perros, seres humanos o similares, el CEP de la SEQ ID NO: 26 o 42 o un factor homólogo del mismo, o el TRIP11 en perros, seres humanos o similar, es significativamente elevada en los pacientes de cáncer, lo que indica que la producción de estos polipéptidos o los factores homólogos de los mismos, que son el antígeno del anticuerpo específico de cáncer, sea significativamente elevada en los pacientes de cáncer. Como se describe de forma concreta en los Ejemplos a continuación, los cánceres pueden también detectarse midiendo el antígeno *per se*. Por lo tanto, de forma similar al Método 1 anterior, los cánceres en un cuerpo vivo pueden detectarse midiendo *per se* el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un factor homólogo del mismo, la calmegina, el CEP de la SEQ ID NO: 26 o 42 o un factor homólogo del mismo, o el TRIP11.

La medición del polipéptido en una muestra puede llevarse a cabo de forma fácil mediante un inmunoensayo bien conocido. De forma específica, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45 o un factor homólogo del mismo, que puede existir en una muestra, se puede medir preparando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que reaccione de forma inmunológica con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o con un factor homólogo del mismo, y después llevar a cabo un inmunoensayo utilizando el anticuerpo preparado o fragmento del mismo. Debido a que, como se explica anteriormente, los anticuerpos tienen reactividad cruzada, puede medirse no solo un polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45 sino también un factor homólogo en otro mamífero, por ejemplo, un factor homólogo humano de la SEQ ID NO: 4, 18, 28 o 47, o un factor homólogo felino, utilizando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que reacciona de forma inmunológica con el polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45. Los inmunoensayos *per se* son métodos convencionales bien conocidos, como se describe anteriormente.

65

La expresión "fragmento de unión a antígeno" en el presente documento significa el fragmento que presenta la propiedad de unión al antígeno del anticuerpo, tal como el fragmento Fab o el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo. Aunque el anticuerpo puede ser ya sea un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, es preferente para los inmunoensayos un anticuerpo monoclonal y similares, debido a que la reproducibilidad es alta. Los métodos para preparar un anticuerpo policlonal o monoclonal utilizando un polipéptido como inmunógeno son bien conocidos, y pueden llevarse a cabo fácilmente mediante un método convencional. Por ejemplo, los anticuerpos frente al polipéptido pueden inducirse inmunizando un animal con un inmunógeno, el polipéptido puede conjugarse a una proteína transportadora tal como la hemocianina de lapa californiana (HLC) o la caseína, junto con un adyuvante. Después, las células que producen anticuerpos, tales como células esplénicas o los linfocitos, se recolectan a partir del animal inmunizado y se fusionan con células de mieloma para preparar hibridomas. Entre los hibridomas, se selecciona y prolifera uno que produce el anticuerpo que se une a la proteína de la SEQ ID NO: 2, 16, 26, 42 o 45, o un factor homólogo de la misma, y después se puede recolectar a partir del sobrenadante del cultivo el anticuerpo cuyo antígeno correspondiente es la proteína mencionada anteriormente. El método descrito anteriormente es un método convencional bien conocido.

En el Método 3 de la presente invención, se mide el ARNm que puede estar contenido en una muestra obtenida de un cuerpo vivo, que codifica uno cualquiera de los polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un factor homólogo del mismo, la calmegina, el CEP de la SEQ ID NO: 26 o 42 o un factor homólogo del mismo, y el TRIP 11. Como se describe de forma concreta en los Ejemplos a continuación, el nivel de expresión del ARNm que codifica el polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2 o el factor homólogo del mismo mostrado en la SEQ ID NO: 4; el ARNm que codifica la calmegina canina de la SEQ ID NO: 16 o la calmegina humana de la SEQ ID NO: 18; el ARNm que codifica el CEP canino de la SEQ ID NO: 26 o 42 o el factor homólogo del mismo mostrado en la SEQ ID NO: 28; y el ARNm que codifica el TRIP11 canino de la SEQ ID NO: 45 o el TRIP11 humano de la SEQ ID NO: 47, es significativamente elevado en las células cancerosas. Por lo tanto, en un cuerpo vivo pueden detectarse los cánceres midiendo el ARNm en una muestra.

Por ejemplo, en una muestra puede cuantificarse el ARNm utilizando un método convencional tal como RT-PCR de detección en tiempo real, utilizando como molde el ARNm y también puede cuantificarse en líneas generales a base de la intensidad de la tinción en una transferencia de Northern convencional. La secuencia de los ADNc que codifican los polipéptidos de las SEQ ID NO: 2, 4, 16, 18, 26, 28, 42, 45 y 47 se muestran en las SEQ ID NO: 1, 3, 15, 17, 25, 27, 44 y 46, respectivamente. Con referencia a estas secuencias, se puede preparar un polinucleótido que hibride de forma específica con una región parcial de la secuencia de bases mostrada en las SEQ ID NO: 1, 3, 15, 17, 25, 27, 41, 44 o 46 (denominado en lo sucesivo en este documento como "polinucleótido para la detección del cáncer") y, utilizando el polinucleótido como una sonda o como un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos, se puede medir la cantidad del ARNm en una muestra. Como se explica a continuación, también puede medirse el ARNm que codifica los factores homólogos en mamíferos que no sean perros o seres humanos, utilizando un polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 3. De forma similar, también puede medirse el ARNm que codifica la calmegina en mamíferos que no sean perros y seres humanos, utilizando un polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 15 o 17; también puede medirse el ARNm que codifica los factores homólogos en mamíferos que no sean perros o seres humanos, utilizando un polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 25, 27 o 41; y también puede medirse el ARNm que codifica el TRIP11 en mamíferos que no sean perros o seres humanos, utilizando un polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 44 o 46. En la presente invención, el polinucleótido puede ser ARN o ADN.

La expresión "hibridar de forma específica" utilizada en el presente documento significa que una determinada secuencia hibrida solo con la región parcial objetivo y sustancialmente no hibrida con las otras regiones en condiciones de hibridación ordinarias.

La expresión "condición de hibridación ordinaria" se refiere a una condición utilizada para el apareamiento en la PCR ordinaria o en la detección ordinaria con sondas. Por ejemplo, en el caso de la PCR con polimerasa Taq, la expresión se refiere a una condición de reacción a una temperatura de apareamiento apropiada de aproximadamente 54 °C a 60 °C, utilizando un tampón común tal como uno que contiene KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3 a 9,0) y MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM. En el caso de la hibridación de Northern, la expresión se refiere a una condición de reacción a una temperatura de hibridación apropiada de 42 °C a 65 °C, utilizando una solución de hibridación común tal como una que contiene SSPE 5 x, formamida al 50 %, solución de Denhardt 5 x y SDS del 0,1 al 0,5 %. Sin embargo debe señalarse que la temperatura de apareamiento y la temperatura de hibridación apropiadas no están restringidas a las ejemplificadas anteriormente, y pueden determinarse a base de la T<sub>m</sub> del cebador o de la sonda, y de las reglas empíricas. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la temperatura apropiada.

La expresión "no hibrida sustancialmente" significa que una hibridación no se produce en absoluto o, incluso si se produce, el grado de hibridación con regiones que no son la región parcial objetivo es considerablemente inferior que el de la hibridación con la región objetivo, de forma que la hibridación con otras regiones se puede ignorar de forma relativa. Los ejemplos del polinucleótido que hibrida de forma específica en tales condiciones incluyen los que tienen

una determinada homología con la región parcial objetivo, por ejemplo los que tienen una homología de no menos del 70 %, preferentemente no menos del 80 %, más preferentemente no menos del 90 %, aún más preferentemente no menos del 93 %, aún más preferentemente no menos del 95 %, aún más preferentemente no menos del 98 % con la región parcial objetivo. Muy preferentemente, el polinucleótido tiene la misma secuencia de bases que la región parcial objetivo. La definición para la homología de secuencias de aminoácidos es la misma que se aplica a la homología de las secuencias de bases. Incluso si un polipéptido para la detección del cáncer comprende en su extremo alguna región que no hibrida con la región objetivo, puede utilizarse para la detección de cánceres una sonda que consista en tal polinucleótido, siempre que la región que hibrida con la región objetivo ocupe aproximadamente la mitad o más de la sonda entera. De forma similar, un cebador que consiste en tal polinucleótido normalmente puede aparearse con la región objetivo, para dejar que se produzca la reacción de extensión y, así, puede utilizarse para detección de cánceres, siempre que la región que hibrida con la región objetivo ocupe aproximadamente la mitad o más del cebador entero y se emplace en el extremo 3' del cebador. Cabe señalar que, en los casos en donde los polinucleótidos para la detección del cáncer comprenden alguna región que no hibrida con la región objetivo en su extremo, la homología de la secuencia de bases objetivo se calcula a base solo de la región que hibrida con la región objetivo, ignorando la región que no hibrida.

En la presente invención, la expresión "región parcial" se refiere a una región que consiste en una parte de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1, 3, 15, 17, 25, 27, 41, 44 o 46. Una "región parcial" consiste preferentemente en no menos de 18 bases consecutivas. Se entiende que "la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1" como se utiliza en el presente documento incluye no solo la secuencia de bases escrita de forma expresa en la SEQ ID NO: 1, sino también la secuencia complementaria de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, la frase "un polinucleótido que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1" incluye un polinucleótido monocatenario que tiene la secuencia de bases escrita de forma expresa en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido monocatenario que tiene la secuencia complementaria a la misma, y un polinucleótido bicatenario compuesto de estos polinucleótidos monocatenarios. Cuando se preparan los polinucleótidos utilizados en la presente invención o los polinucleótidos que codifican los polipéptidos utilizados en la presente invención, debería seleccionarse de forma apropiada una cualquiera de estas secuencias de bases y los expertos en la materia pueden llevar a cabo fácilmente la selección.

En vista de asegurar la especificidad, el número de bases del polinucleótido para la detección del cáncer preferentemente no es de menos de 18 bases. En los casos en donde el polinucleótido se utiliza como una sonda, el tamaño preferentemente no es de menos de 18 bases, más preferentemente no es de menos de 20 bases, y no más de la longitud completa de la región codificante. En los casos en donde el polinucleótido se utiliza como un cebador, el tamaño es preferentemente de no menos de 18 bases, y preferentemente de no más de 50 bases. Los ejemplos preferentes del polinucleótido para la detección del cáncer incluyen los que consisten en no menos de 18 bases consecutivas de la secuencia de bases mostrada en las SEQ ID NO: 1, 3, 15, 17, 25, 27, 41, 44 o 46.

Es obvio para los expertos en la materia a los que se refiere la presente memoria descriptiva que un polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial de la SEQ ID NO: 1, 15, 25 o 44 se utiliza para la medición del ARNm que codifica el polipéptido canino de la SEQ ID NO: 2, 16, 26 o 45, respectivamente; y que un polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial de la SEQ ID NO: 3, 17, 27 o 46 se utiliza para una medición del ARNm que codifica un factor homólogo humano de la SEQ ID NO: 4, 18, 28 o 47, respectivamente. Debe señalarse que los factores homólogos habitualmente comparten alta homología entre sí, incluso al nivel de secuencia de bases. Por ejemplo, las SEQ ID NO: 1 y 3 comparten el 93 % de homología, las SEQ ID NO: 15 y 17 comparten el 90 % de homología, las SEQ ID NO: 25 y 27 comparten el 87 % de homología y las SEQ ID NO: 44 y 46 comparten el 88 % de homología, que son homologías muy elevadas. Por lo tanto, un polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial de la SEQ ID NO: 1, 15, 25 o 44 también puede hibridar de forma específica con la región parcial correspondiente de la SEQ ID NO: 3, 17, 27 o 46, respectivamente. Como se demuestra de forma práctica en los Ejemplos a continuación, por ejemplo utilizando un conjunto de cebadores que tengan las secuencias de bases mostradas en las SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente, pueden medirse tanto los ARNm que codifican el polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2 como el ARNm que codifica el factor homólogo humano de la SEQ ID NO: 4, debido a que los cebadores respectivos hibridan de forma específica no solo con una región parcial de la SEQ ID NO: 1 sino también con una región parcial de la SEQ ID NO: 3 (Ejemplo A). Utilizando un conjunto de cebadores que tenga las secuencias de bases mostradas en las SEQ ID NO: 19 y 20, respectivamente, pueden medirse el ARNm que codifica la calmegina canina de la SEQ ID NO: 16 y el ARNm que codifica el factor homólogo humano, la calmegina humana de la SEQ ID NO: 18, debido a que los cebadores respectivos hibridan de forma específica no solo con una región parcial de la SEQ ID NO: 15 sino también con una región parcial de la SEQ ID NO: 17 (Ejemplo B). Utilizando un conjunto de cebadores que tengan las secuencias de bases mostradas en las SEQ ID NO: 29 y 30, respectivamente, pueden medirse el ARNm que codifica el CEP canino de la SEQ ID NO: 26 o 42 y el ARNm que codifica el factor homólogo humano, el CEP humano de la SEQ ID NO: 28, debido a que los cebadores específicos hibridan de forma específica con una región parcial de la SEQ ID NO: 25, con una región parcial de la SEQ ID NO: 27 y también con una región parcial de la SEQ ID NO: 41 (Ejemplo C). Utilizando un conjunto de cebadores que tengan las secuencias de bases mostradas en las SEQ ID NO: 48 y 49, respectivamente, pueden medirse el ARNm que codifica el TRIP11 canino de la SEQ ID NO: 45 y el ARNm que codifica el factor homólogo humano, el TRIP11 humano de la SEQ ID NO: 47, debido a que los cebadores respectivos hibridan de forma específica no solo con una región parcial de la SEQ ID NO: 44 sino también con una

región parcial de la SEQ ID NO: 46 (Ejemplo D). Por lo tanto, por ejemplo utilizando el polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial de la secuencia de bases canina mostrada en la SEQ ID NO: 1; la SEQ ID NO: 15; la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 44, pueden medirse no solo el ARNm que codifica el polipéptido canino de la SEQ ID NO: 2; la SEQ ID NO: 16; las SEQ ID NO: 26 y 42 o las SEQ ID NO: 45 sino también el ARNm que codifica el factor homólogo de los mismos, el polipéptido de la SEQ ID NO: 4; la SEQ ID NO: 18; la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 47, respectivamente. Además, también puede medirse utilizando los mismos polinucleótidos el ARNm que codifica el factor homólogo en otros mamíferos tales como gatos.

En el diseño de un polinucleótido para la detección del cáncer, es más conveniente seleccionar una región parcial en la cual la homología entre las SEQ ID NO: 1 y 3; las SEQ ID NO: 15 y 17; las SEQ ID NO: 25 y 27 o las SEQ ID NO: 44 y 46 sea especialmente elevada (preferentemente una región parcial que tenga la misma secuencia). Se espera que una región especialmente homóloga de forma elevada entre perro y ser humano también comparta una homología muy elevada con una determinada región parcial de los genes homólogos en otras especies animales. Por lo tanto, seleccionando una región parcial de tal manera se puede mejorar la precisión de la medición del ARNm que codifica factores homólogos en especies animales que no sean perro y ser humano.

Son bien conocidos los métodos *per se* para la medición de un ácido nucleico de prueba que utilizan un polinucleótido que hibrida de forma específica con una región parcial del ácido nucleico de prueba, como un cebador para un método de amplificación de genes tal como PCR o como una sonda, e incluyen transferencia de Northern, hibridación *in situ* y similares, así como RT-PCR como se describe en detalle en los siguientes Ejemplos. Pueden utilizarse para medir el nivel de ARN en la presente invención cualquiera de estos métodos de medición bien conocidos.

Son bien conocidos en la técnica los métodos de amplificación de ácidos nucleicos *per se*, tales como la PCR, y también están disponibles de forma comercial los kits de reactivos y los aparatos, de modo que pueden llevarse a cabo fácilmente. Es decir, por ejemplo un ácido nucleico de prueba que sirve como un molde (por ejemplo, ADNc del gen que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, 4, 16, 18, 26, 28, 45 o 47) y una pareja de polinucleótidos para la detección del cáncer (cebadores) se mezclan en un tampón conocido en presencia de la polimerasa Taq y los dNTP, y se llevan a cabo las etapas de desnaturalización, apareamiento y extensión cambiando la temperatura de la mezcla de reacción. Habitualmente, la etapa de desnaturalización se lleva a cabo a entre 90 y 95 °C, la etapa de apareamiento se lleva a cabo a una T<sub>m</sub> de entre el molde y los cebadores o una vecindad de la misma (preferentemente dentro de ±4 °C) y la etapa de extensión se lleva a cabo a 72 °C, que es la temperatura óptima de la polimerasa Taq. El tiempo de reacción de cada etapa se selecciona de entre aproximadamente 30 segundos a 2 minutos. Repitiendo este ciclo térmico durante aproximadamente 25 a 40 veces, se amplifica la región entre una pareja de cebadores. El método de amplificación de ácidos nucleicos no se restringe a la PCR, y también pueden emplearse otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos bien conocidos en la técnica. Llevando a cabo el método de amplificación de ácidos nucleicos para la detección del cáncer, utilizando como cebadores una pareja de los polinucleótidos descritos anteriormente y utilizando como molde el ácido nucleico de prueba, se amplifica el ácido nucleico de prueba. Por el contrario, en los casos en donde el ácido nucleico de prueba no está contenido en la muestra, la amplificación no se produce. Por lo tanto, detectando el producto de amplificación se puede determinar si el ácido nucleico de prueba existe o no en la muestra. La detección del producto de amplificación puede llevarse a cabo mediante un método en el que la solución de reacción se somete tras la amplificación a electroforesis y después se tiñen las bandas con bromuro de etidio o similar, o mediante un método en el que tras la electroforesis se inmoviliza el producto de amplificación en una fase sólida tal como una membrana de nylon; una sonda marcada que hibrida de forma específica con el ácido nucleico de prueba se hibrida con el ácido nucleico de prueba y después se detecta el marcador tras el lavado. Como alternativa, el ácido nucleico de prueba se puede cuantificar en la muestra mediante la denominada PCR de detección en tiempo real, utilizando un colorante fluorescente extintor y un colorante fluorescente indicador. Dado que los kits para la PCR de detección en tiempo real también están disponibles de forma comercial, la PCR de detección en tiempo real también puede llevarse a cabo de forma fácil. El ácido nucleico de prueba también puede semicuantificarse a base de la intensidad de la banda electroforética. El ácido nucleico de prueba puede ser ARNm o ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARNm. En los casos en los que se amplifica ARNm como ácido nucleico de prueba también puede utilizarse el método NASBA (método 3 SR, método TMA) utilizando la pareja de cebadores descrita anteriormente. El método NASBA *per se* es bien conocido, y están disponibles de forma comercial los kits para el mismo, de forma que el método NASBA puede llevarse a cabo fácilmente utilizando la pareja de cebadores descrita anteriormente.

Para la detección del cáncer puede utilizarse como sonda una sonda marcada obtenida marcando el polinucleótido descrito anteriormente con un marcador fluorescente, un marcador radiactivo, un marcador de biotina o similar. Los métodos *per se* para el marcaje de un polinucleótido son bien conocidos. Se puede determinar si el ácido nucleico de prueba existe o no en la muestra inmovilizando el ácido nucleico de prueba o el producto de amplificación del mismo en una fase sólida, hibridando a él la sonda marcada, y midiendo el marcador unido a la fase sólida tras el lavado. Como alternativa, se puede inmovilizar el polinucleótido para la detección del cáncer en una fase sólida para hibridar a él el ácido nucleico de prueba y detectar el ácido nucleico de prueba unido a la fase sólida mediante una sonda marcada o similar. En tal caso, también se denomina como sonda el polinucleótido para la detección del cáncer inmovilizado en la fase sólida. Los métodos para medir un ácido nucleico de prueba utilizando una sonda de

5 polinucleótido son bien conocidos en la técnica, y pueden lograrse poniendo en contacto una sonda de polinucleótido con el ácido nucleico de prueba, en un tampón a la  $T_m$  o en la vecindad de la misma (preferentemente dentro de  $\pm 4$  °C) de modo que hibriden, y después midiendo la sonda marcada hibridada o el ácido nucleico de prueba unido a la sonda inmovilizada. Tal método incluye métodos bien conocidos tales como la transferencia de Northern y la hibridación *in situ*, y la transferencia de Southern. Puede utilizarse en la presente invención cualquiera de tales métodos conocidos.

10 En el método de detección de la presente invención, se determina si el cuerpo vivo objetivo padece cáncer o no, o similar, a base del nivel de expresión del polipéptido medido como se describe anteriormente. Aunque la detección del cáncer puede lograrse simplemente midiendo la expresión del polipéptido en el cuerpo vivo objetivo, es preferente obtener el valor de referencia normal determinando el nivel de expresión del polipéptido (la cantidad del anticuerpo, polipéptido o ARNm) en una o más muestras procedentes de individuos sanos, para comparar el valor medido en el cuerpo vivo objetivo con el valor de referencia normal, en vista de aumentar la precisión de la medición. Para aumentar adicionalmente la precisión de la medición, se puede obtener el valor de referencia del cáncer determinando el nivel de expresión del polipéptido en las muestras obtenidas a partir de muchos pacientes que se ha revelado que padecen cáncer, para comparar el valor medido del cuerpo vivo objetivo con los valores de referencia normales y para el cáncer. Los valores de referencia mencionados anteriormente se pueden determinar expresando el nivel de expresión del polipéptido en cada muestra en valores y calculando el valor promedio de los mismos. Los valores de referencia normales y para el cáncer se pueden determinar de antemano midiendo el nivel de expresión del polipéptido en muchos sujetos sanos y con cáncer. Por lo tanto, los valores de referencia predeterminados también pueden utilizarse cuando se compara el valor medido con los valores de referencia en la presente invención.

25 En los casos en donde la detección de cáncer se lleva a cabo a base de los niveles de expresión de dos o más de los cuatro polipéptidos descritos anteriormente, se puede determinar que el cuerpo vivo objetivo padece cáncer cuando el nivel de expresión de uno cualquiera de los polipéptidos indica cáncer (véase el Ejemplo E a continuación).

30 El método de detección de la presente invención puede llevarse a cabo en combinación con el diagnóstico utilizando otros antígenos para cáncer y/o marcadores para cáncer, de forma que se pueda mejorar más la precisión de la detección de los cánceres. Por ejemplo, en la medición del anticuerpo específico para cáncer mencionado anteriormente de acuerdo con la presente invención, puede utilizarse como un antígeno otro polipéptido (o polipéptidos) expresado de forma elevada en tejidos cancerosos, de la misma manera que los polipéptidos descritos anteriormente. El método de la presente invención también puede llevarse a cabo en combinación con el diagnóstico utilizando marcadores de cáncer conocidos.

40 Mediante el método de detección de la presente invención, se pueden detectar cánceres en un cuerpo vivo. En especial, como se describe en los siguientes Ejemplos, el método de la presente invención puede detectar incluso un cáncer pequeño invisible o un cáncer que existe en una parte profunda de un cuerpo, y así el método es útil para la detección temprana de los cánceres. Además, aplicando el método de detección de la presente invención a pacientes en el período de seguimiento tras la terapia para el cáncer, puede detectarse el cáncer recurrente, si lo hay, en su fase temprana.

45 Si en un cuerpo vivo portador de cáncer proliferan más células cancerosas que expresan el polipéptido establecido a medir en la presente invención, se acumulan en el cuerpo más polipéptidos y ARNm que los codifican, lo que provoca el aumento de la cantidad de anticuerpos frente a los polipéptidos mencionados anteriormente en el suero. Por otro lado, cuanto más disminuyan las células cancerosas, más disminuyen los polipéptidos y los ARNm que los codifican acumulados en el cuerpo, lo que provoca la disminución de la cantidad de los anticuerpos frente a los polipéptidos mencionados anteriormente en el suero. Por lo tanto, si el nivel de expresión del polipéptido establecido es elevado, se puede determinar que se produce crecimiento tumoral y/o metástasis del cáncer, es decir, la fase de evolución del cáncer es avanzada. De hecho, como se describe de forma concreta en los Ejemplos a continuación, se observó que la cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente aumenta en el suero del cuerpo portador de cáncer junto con la evolución del cáncer tal como crecimiento tumoral o metástasis. Por lo tanto, mediante el método de la presente invención se puede detectar la fase de la evolución del cáncer.

55 Además, como se muestra en el Ejemplo a continuación, cuando se compara entre el mismo tipo de tumores, uno maligno produce significativamente más cantidad de anticuerpos que uno benigno. Por lo tanto, si el nivel de expresión de los polipéptidos establecidos es elevado, se puede determinar que el grado de malignidad del cáncer es elevado. Es decir, mediante el método de la presente invención también puede detectarse el grado de malignidad del cáncer.

60 Además, el efecto de la terapia para el cáncer se puede controlar a base del aumento o disminución del nivel de expresión de los polipéptidos establecidos. Como se describe en el Ejemplo a continuación, en comparación con el estado portador de cáncer, los individuos que reciben un fármaco antineoplásico para la prevención de la reaparición tras la extirpación del tumor muestran expresión disminuida de los polipéptidos. Esto se aplica a los tumores benignos. Es decir, en los casos en donde se puede observar la expresión de los polipéptidos, la expresión

disminuida de los polipéptidos se observa cuando se logra la extirpación completa del tumor benigno. Por lo tanto, observando el nivel de expresión de los polipéptidos mencionados anteriormente en individuos durante o tras la terapia para el cáncer, se puede lograr un indicio para evaluar que tan eficaz fue el fármaco antineoplásico administrado, o si se ha dejado en el paciente una porción del tumor tras la extirpación del mismo, así como puede

5 lograrse durante el seguimiento un indicio para hallar metástasis y/o reaparición tan pronto como sea posible. Si el cáncer se trata de forma apropiada en un paciente, el nivel de expresión de los polipéptidos se hace más bajo en el paciente tras la terapia que antes de la terapia. En tal caso, se puede determinar que el efecto de la terapia que se realizó (o se está realizando) en el paciente es bueno. En los casos en donde el nivel de expresión de los

10 polipéptidos aumenta o se sostiene, o una vez que se reduce y después aumenta, se puede determinar que el efecto de la terapia no es lo suficientemente bueno. Por lo tanto, puede obtenerse una base útil para la adopción de la estrategia terapéutica. Por ejemplo, a base del cambio del nivel de expresión descrito anteriormente, se puede determinar si la estrategia terapéutica debería cambiarse a otra, si (o como) se debe cambiar la dosis del fármaco antineoplásico, y así.

15 Los cánceres a detectar mediante el método de la presente invención son los que expresan al menos el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un factor homólogo del mismo. Los ejemplos del cáncer a detectar incluyen, pero sin limitación, tumores cerebrales; carcinomas de células escamosas de cabeza, cuello, pulmón, útero y esófago; melanoma; adenocarcinomas de pulmón y útero; cáncer renal; tumor mixto maligno; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células basales; epulis acantomatoso; tumor intraoral; adenocarcinoma perianal; tumor de la glándula

20 anal; carcinoma apocrino de la glándula anal; tumor de células de Sertoli; cáncer de vulva; adenocarcinoma sebáceo; epiteloma sebáceo; adenoma sebáceo; carcinoma de glándulas sudoríparas; adenocarcinoma intranasal; adenocarcinoma nasal; cáncer de tiroides; cáncer de colon; adenocarcinoma bronquial; adenocarcinoma; carcinoma ductal; adenocarcinoma mamario; adenocarcinoma mamario combinado; tumor mixto maligno de la glándula mamaria; adenocarcinoma papilar intraductal; fibrosarcoma; hemangiopericitoma; osteosarcoma; condrosarcoma;

25 sarcoma de tejidos blandos; sarcoma histiocítico; mixosarcoma; sarcoma indiferenciado; cáncer de pulmón; mastocitoma; liomioma cutáneo; liomioma intra abdominal; liomioma; leucemia linfocítica crónica; linfoma; linfoma gastrointestinal; linfoma de los órganos digestivos; linfoma de células pequeñas o de células medianas; tumor adrenomedular; tumor de células de la granulosa; feocromocitoma; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales); inflamación supurante; tumor de hígado intra abdominal; cáncer de hígado; plasmocitoma;

30 hemangiopericitoma maligno; angiosarcoma; adenocarcinoma de la glándula anal; cáncer oral; melanoma maligno metastásico; melanoma maligno amelanítico; melanoma maligno cutáneo; mioepitelioma maligno; seminoma maligno; seminoma; adenocarcinoma del intestino grueso; adenocarcinoma gástrico; carcinoma sebáceo de escasa malignidad; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma apocrino; carcinoma de las glándulas sebáceas apocrino poco diferenciado; histiocitoma fibroso maligno; mieloma múltiple; tumor maligno mesenquimatoso; liposarcoma;

35 osteosarcoma; sarcoma idiopático; sarcoma de partes blandas (tumor de células fusiformes); sarcoma poco diferenciado; sarcoma sinovial; angiosarcoma; epiteloma maligno metastásico; adenocarcinoma mamario tubular; carcinoma ductal mamario; cáncer de mama inflamatorio; germinoma; leucemia; tricoepitelioma invasivo; linfoma de células medianas; linfoma multicéntrico; osteosarcoma (glándula mamaria); mastocitoma (de tipo II según Patnaik); mastocitoma (de grado II) y liomiosarcoma. Los cuerpos vivos a los que se aplica el método de la presente invención son mamíferos, preferentemente seres humanos, perros y gatos.

La muestra sujeta al método de la presente invención incluye fluidos corporales tales como sangre, suero, plasma, ascitis y efusión pleural, y tejidos y células. En particular, en el Método 1 y el Método 2 anteriores pueden usarse preferentemente suero, plasma, ascitis y efusión pleural. En el caso del Método 3 anterior en el que se mide ARNm

45 son preferentes una muestra de tejido y una muestra de células.

Pueden proporcionarse como un reactivo para la detección de un cáncer (o cánceres) los polipéptidos utilizados como antígeno para el inmunoensayo del Método 1 (es decir, un polipéptido obtenido de canino de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 26 o 42, o la SEQ ID NO: 45, y los factores homólogos de los mismos, los

50 polipéptidos parciales reactivos de forma específica, los polipéptidos modificados reactivos de forma específica y los polipéptidos añadidos reactivos de forma específica). El reactivo puede consistir solo en el polipéptido mencionado anteriormente, o puede contener diversos aditivos útiles para estabilizar el polipéptido y similares. Además, el reactivo puede proporcionarse en forma que esté inmovilizado en una fase sólida, tal como una placa o una membrana.

55 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reaccionan de forma inmunológica con el polipéptido canino de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 26 o 42, o la SEQ ID NO: 45, o un factor homólogo de los mismos, que se utilizan para medir el polipéptido canino o el factor homólogo del mismo mediante inmunoensayo, también pueden proporcionarse como un reactivo para la detección de un cáncer (o cánceres). El reactivo también puede consistir solo en el anticuerpo mencionado anteriormente o en los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o puede contener diversos aditivos útiles para estabilizar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo y similares. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo también puede estar en forma de estar conjugado con un metal tal como manganeso o hierro. Dado que tal anticuerpo conjugado con metal o fragmento de unión al antígeno del mismo, cuando se administra a un cuerpo se acumula en un sitio en

60 que existe una gran cantidad de proteína antigénica, la existencia de células cancerosas que producen la proteína antigénica se puede detectar midiendo el metal mediante RM o similar.

65

Además, los polinucleótidos descritos anteriormente para la detección del cáncer, utilizados para medir el ARNm en el Método 3, también pueden proporcionarse como un reactivo para la detección de un cáncer (o cánceres). El reactivo puede consistir solo en el polinucleótido, o puede contener diversos aditivos útiles para estabilizar el polinucleótido y similares. El polinucleótido para la detección del cáncer contenido en el reactivo es preferentemente un cebador o una sonda. Las condiciones y los ejemplos preferentes del polinucleótido para la detección del cáncer son como ya se ha descrito anteriormente.

### Ejemplos

10 La presente invención se describirá ahora de forma más concreta mediante los Ejemplos.

Ejemplo A-1: adquisición de una proteína antigénica para el cáncer nueva mediante el método SEREX

(1) Preparación de la biblioteca de ADNc

15 Se preparó ARN total a partir de tejido testicular de un perro sano mediante el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo y se purificó el ARN poli(A) utilizando el kit de purificación de ARNm Oligotex-dT30 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.), en conformidad con el protocolo adjunto al kit.

20 Utilizando el ARNm obtenido (5 µg) se sintetizó una fagoteca de ADNc de testículo de perro. La preparación de la fagoteca de ADNc se llevó a cabo utilizando el kit de síntesis de ADNc, el kit de síntesis de ZAP-ADNc y el kit de clonación ZAP-ADNc Gigapack III Gold (fabricados por STRATAGENE), en conformidad con los protocolos adjuntos a los kits. El tamaño de la fagoteca de ADNc preparada fue de  $1,3 \times 10^6$  ufp/ml.

25 (2) Exploración de la biblioteca de ADNc con suero

Se llevó a cabo la inmunoexploración utilizando la fagoteca de ADNc obtenida de testículo de perro preparada como se describe anteriormente. De forma más particular, se infectaron células hospedadoras de *E. coli* (XL1-Blue MRF<sup>+</sup>) con la biblioteca de forma que debían aparecer 2.340 clones sobre una placa de agarosa NZY que tenía el tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm, y se cultivaron a 42 °C durante 3 a 4 horas para dejar que el fago forme placas. La placa se cubrió con membrana de nitrocelulosa (Hybond C Extra: fabricado por GE Healthcare BioScience) impregnada con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) a 37 °C durante 4 horas para inducir y expresar las proteínas, que se transfirieron así a la membrana. Posteriormente, la membrana se recubrió y se empapó en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 %, seguido de su agitación a 4 °C durante una noche para suprimir reacciones no específicas. Se dejó que el filtro reaccionara con el suero de paciente canino diluido 500 veces a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.

Como el suero de los pacientes caninos descrito anteriormente se utilizó suero recolectado de pacientes caninos que padecían carcinoma de células escamosas. El suero se almacenó a -80 °C y se pretrató inmediatamente antes de su uso. El método de pretratamiento del suero fue como sigue. A saber, se infectaron células hospedadoras *E. coli* (XL1-Blue MRF<sup>+</sup>) con fago λ ZAP Express en el que no se había insertado ningún gen extraño, y después se cultivaron en placas de medio NZY a 37 °C durante una noche. Posteriormente, se añadió a la placa tampón de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 8,3 que contenía NaCl 0,5 M, y se dejó la placa reposar a 4 °C durante 15 horas, seguido de la recolección del sobrenadante como un extracto de *E. coli*/fago. Después de eso, se dejó que el extracto recolectado de *E. coli*/fago fluyera a través de una columna de NHS (fabricada por GE Healthcare BioScience) para inmovilizar proteínas obtenidas de *E. coli*/fago en ella. Se dejó que el suero procedente de pacientes caninos fluyera a través y reaccionara con esta columna de proteína inmovilizada para eliminar anticuerpos adsorbidos en *E. coli* y/o el fago. La fracción de suero que pasó a través de la columna se diluyó 500 veces con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 %, y el diluyente resultante se utilizó como el material para la inmunoexploración.

La membrana sobre la que el suero así tratado y la proteína de fusión descrita anteriormente se transfirieron se lavó 4 veces con TBS-T (Tween 20 al 0,05 %/TBS), y se dejó que reaccionara con cabra anti IgG de perro (cabra anti IgG h+I de perro conjugado con HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) diluido 5.000 veces con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 % como el anticuerpo secundario, a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de la detección mediante la reacción de coloración enzimática utilizando la solución de reacción NBT/BCIP (fabricada por Roche). Las colonias en las posiciones en donde se observó una reacción de coloración positiva se recuperaron a partir de la placa de agarosa NZY que tenían el tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm y se disolvieron en 500 µl de tampón SM (NaCl 100 mM, MgClSO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl 50 mM, gelatina al 0,01 %; pH 7,5). La exploración se repitió como segunda y tercera exploración de la misma manera que se describe anteriormente, hasta que se obtuvo una única colonia positiva para la reacción de coloración, aislando de este modo un clon positivo tras la exploración de 30.940 clones de fago reactivos con las IgG en el suero.

(3) Búsqueda de homología del gen del antígeno aislado

65 Para someter el único clon positivo aislado mediante el método descrito anteriormente a un análisis de secuencia de bases, se llevó a cabo un procedimiento de conversión del vector de fago a un vector plasmídico. De formas más

- particular, se mezclaron 200 µl de una solución preparada para contener un hospedador *E. coli* (XL1-Blue MRF') de forma que la absorbancia DO<sub>600</sub> debía ser de 1,0 con 100 µl de una solución de fago purificado y adicionalmente con 1 µl de fago auxiliar ExAssist (fabricado por STRATAGENE), y se dejó que la reacción transcurra a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron 3 ml de medio LB a la mezcla de reacción, y se cultivó la mezcla a 37 °C durante 2,5 a 3 horas, seguido de la incubación inmediata en un baño de agua a 70 °C durante 20 minutos. Después, la mezcla se centrifugó a 4 °C a 1.000 x g durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante como una solución de fagémido. Posteriormente, se mezclaron 200 µl de una solución preparada para contener un *E. coli* hospedador de fagémido (SOLR) de forma que la absorbancia DO<sub>600</sub> debía ser de 1,0 con 10 µl de una solución de fago purificado, y se dejó transcurrir la reacción a 37 °C durante 15 minutos. Después de eso, se sembraron en placas 50 µl de la mezcla de reacción en medio de agar LB que contenía ampicilina (concentración final: 50 µg/ml), y se cultivó a 37 °C durante una noche. Se recuperó una única colonia de SOLR transformada y se cultivó en medio LB que contenía ampicilina (concentración final: 50 µg/ml) a 37 °C, seguido de la purificación del ADN plasmídico que tenía un inserto de interés utilizando el plásmido kit QIAGEN Miniprep plasmid (fabricado por Qiagen).
- 15 El plásmido purificado se sometió a un análisis de la secuencia entera del inserto mediante el método de cebador en avance utilizando el cebador de T3 descrito en la SEQ ID NO: 5 y el cebador de T7 descrito en la SEQ ID NO: 6. Mediante este análisis de secuencia se obtuvo la secuencia génica descrita en la SEQ ID NO: 1. Utilizando la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de este gen, se llevó a cabo la búsqueda de homología frente a genes conocidos utilizando el programa de búsqueda de homología BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).
- 20 Como resultado, se reveló que el gen obtenido es el gen (n.º de Referencia XM\_535343) que codifica una proteína (n.º de Referencia XP\_535343) cuya función es desconocida. El factor homólogo humano de este gen fue el gen (n.º de Referencia NM\_152660) que codifica una proteína (n.º de Referencia NP\_689873) cuya función también es desconocida (homología: secuencia de bases, el 93 %; secuencia de aminoácidos, el 99 %). La secuencia de bases del factor homólogo humano se muestra en la SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en la SEQ ID NO: 4.

#### (4) Análisis de la expresión en cada tejido

- La expresión del gen que se obtuvo mediante el método descrito anteriormente, en tejidos normales y diversas líneas celulares de perro y de ser humano se investigó mediante el método de RT-PCR (transcripción inversa-PCR). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo como sigue. A saber, se extrajo ARN total a partir de 50 a 100 mg de cada tejido o de 5 a 10 x 10<sup>6</sup> células de cada línea celular utilizando reactivo TRIZOL (fabricado por Invitrogen) en conformidad con el protocolo adjunto al kit. Utilizando este ARN total se sintetizó ADNc mediante el sistema de síntesis de la primera cadena Superscript para RT-PCR (fabricado por Invitrogen) en conformidad con el protocolo adjunto al kit. Como los ADNc procedentes de tejidos normales de ser humano (cerebro, hipocampo, testículo, colon y placenta), se utilizó ADNc Gene Pool (fabricado por Invitrogen), ADNc QUICK-Clone (fabricado por CLONTECH) y la biblioteca de ADNc de inserto grande (fabricado por CLONTECH). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo como sigue, utilizando cebadores (descritos en las SEQ ID NO: 7 y 8) específicos para el gen canino obtenido y su gen homólogo humano. A saber, los reactivos respectivos y el tampón adjunto se mezclaron de forma que la mezcla debía contener 0,25 µl de la muestra preparada mediante la reacción de transcripción inversa, cada uno de los cebadores anteriores 2 µM, cada uno de los dNTP 0,2 mM y polimerasa ExTaq 0,65 U (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) en un volumen total de 25 µl, y la reacción se llevó a cabo con 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto, utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Los cebadores específicos para el gen que tenían las secuencias de bases mostradas en las SEQ ID NO: 7 y 8 descritas anteriormente fueron los que amplifican las regiones de las bases 87 a 606 de la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1 y las bases 173 a 695 de la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3, y que pueden utilizarse para la investigación de la expresión tanto del gen canino como de su gen homólogo humano. Como un control para la comparación, se utilizaron de forma simultánea cebadores específicos (descritos en las SEQ ID NO: 9 y 10) para GAPDH. Como resultado, como se muestra en la Fig. 1, se observó en testículo, entre los tejidos normales de perro, una fuerte expresión del gen canino obtenido, y por otro lado, se observó una fuerte expresión en la línea celular de cáncer de mama canina. Se confirmó la expresión del gen homólogo humano, como es el caso con el gen canino, solo en testículo entre los tejidos normales humanos, pero entre las líneas celulares de cáncer humanas se detectó expresión en células de tumor cerebral, leucemia, cáncer de mama y cáncer de pulmón. Por lo tanto, también se confirmó que el gen homólogo humano se expresa de forma específica en células de testículo y cancerosas.
- 55 En la Fig. 1, el número de referencia 1 en las ordenadas indica el patrón de expresión del gen identificado anteriormente, y el número de referencia 2 indica el patrón de expresión del gen *GAPDH* como un control para la comparación.

- 60 Ejemplo A-2: preparación de las proteínas antigénicas de cáncer nuevas

#### (1) Preparación de la proteína recombinante

- 65 A base del gen de la SEQ ID NO: 1 obtenido en el Ejemplo A-1, se preparó una proteína recombinante mediante el siguiente método. Se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 1 µl del vector que se preparó a partir de la solución de fagémido obtenida en el Ejemplo A-1 y que se

5 sometió al análisis de secuencia, cada uno de los dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* (descritos en las SEQ ID NO: 11 y 12) 0,4  $\mu$ M, dNTP 0,2 mM y la polimerasa PrimeSTAR HS (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) 1,25 U, en un volumen total de 50  $\mu$ l, y se llevó a cabo la PCR con 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 1 minuto, utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Utilizando los dos tipos de cebadores descritos anteriormente, se obtuvo la región que codifica la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 2. Tras la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 %, y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 930 pb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

10 El fragmento de ADN purificado se ligó en un vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante, y después de eso se recuperaron los plásmidos, seguido de la confirmación mediante secuenciación de que el fragmento génico amplificado coincidía con la secuencia de interés. El plásmido que coincidía con la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick, seguido de la inserción de la secuencia génica de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET16b (fabricado por Novagen) que se había tratado con *NdeI* y *XhoI*. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante de fusión etiquetada con His. Se transformó con este plásmido la *E. coli* para expresión, BL21 (DE3) y se indujo en *E. coli* la expresión de la proteína de interés con IPTG 1 mM.

20 Por otro lado, a base del gen de la SEQ ID NO: 3 se preparó mediante el siguiente método una proteína recombinante del gen homólogo humano. Se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 1  $\mu$ l del ADNc preparado en el Ejemplo A-1 cuya expresión en diversos tejidos/células pudo confirmarse mediante el método de RT-PCR, cada uno de los dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción *EcoRV* y *EcoRI* (descritos en las SEQ ID NO: 13 y 14) 0,4  $\mu$ M, dNTP 0,2 mM y polimerasa PrimeSTAR HS (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) 1,25 U, en un volumen total de 50  $\mu$ l, y la PCR se llevó a cabo con 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 1 minuto, utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Utilizando los dos tipos de cebadores descritos anteriormente se obtuvo la región que codifica la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 4. Tras la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1 %, y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 930 pb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

35 El fragmento de ADN purificado se ligó en un vector de expresión pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante, y después de eso se recuperaron los plásmidos, seguido de la confirmación mediante secuenciación de que el fragmento génico amplificado coincide con la secuencia de interés. El plásmido que coincide con la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *EcoRV* y *EcoRI* y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick, seguido de la inserción de la secuencia génica de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET30a (fabricado por Novagen) que se había tratado con *EcoRV* y *EcoRI*. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante de fusión etiquetada con His. Se transformó con este plásmido la *E. coli* para la expresión, BL21 (DE3), y se indujo en *E. coli* la expresión de la proteína de interés con IPTG 1 mM.

## (2) Purificación de la proteína recombinante

45 Las células *E. coli* recombinantes obtenidas anteriormente que expresan la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3, respectivamente, se cultivaron en medio LB que contenía ampicilina (concentración final: 100  $\mu$ g/ml) a 37 °C hasta que se alcanzó la absorbancia a 600 nm de aproximadamente 0,7, y después se añadió IPTG al mismo de forma que su concentración final debía ser de 1 mM, seguido de su cultivo a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, las células se recolectaron mediante centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos. El sedimento de las células se suspendió en solución salina tamponada con fosfato y para lavar las células se sometió adicionalmente a una centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos.

55 Las células se suspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y se trataron con ultrasonido en hielo. La solución de *E. coli* tratada con ultrasonido se centrifugó a 6.000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante como la fracción soluble y el precipitado como la fracción insoluble.

La fracción insoluble se suspendió en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces y se llevó a cabo un procedimiento de eliminación de proteasas.

60 El residuo se suspendió en hidrocloreto de guanidina 6M (fabricado por Sigma Aldrich Japón), tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía cloruro de sodio 0,15 M, y la suspensión resultante se dejó reposar a 4 °C durante 15 horas para desnaturalizar las proteínas. Después de eso se centrifugó la suspensión a 6.000 rpm durante 30 minutos, y la fracción soluble obtenida se colocó en una columna quelante de níquel preparada mediante un método convencional (transportador: Chelating Sepharose (marca registrada) Fast Flow (GE Health Care); volumen de la columna: 5 ml; tampón de equilibrado: hidrocloreto de guanidina 6 M, tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía cloruro de sodio 0,15 mM, seguido por dejarlo reposar a 4 °C durante una noche para dejar la adsorción al transportador quelado con níquel. El sobrenadante se recuperó mediante centrifugación de este transportador de

columna a 1.500 rpm durante 5 minutos, y el transportador de columna se suspendió en solución salina tamponada con fosfato, seguido del relleno de la columna con la suspensión resultante.

La fracción que no se adsorbió a la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón acetato 0,1 M (pH 4,0) que contenía cloruro de sodio 0,5 M, e inmediatamente se llevó a cabo la elución con tampón acetato 0,1 M (pH 3,0) que contenía cloruro de sodio 0,5 M. En cada etapa de elución se recolectaron seis volúmenes de columna de la fracción eluida. La elución de las proteínas de interés se confirmó mediante tinción de Coomassie llevada a cabo de acuerdo con un método convencional. A base del resultado, las fracciones eluidas se desalaron y concentraron para obtener el material para ser la fase sólida para el diagnóstico.

Ejemplo A-3: diagnóstico del cáncer utilizando proteína canina recombinante

(1) Diagnóstico del cáncer en perros

Se recolectaron muestras de sangre procedentes de 486 pacientes caninos en los que se encontraron tumores malignos o benignos y de 6 perros sanos, y se separaron los sueros de ellas. Utilizando la proteína canina recombinante preparada en el Ejemplo A-2 y anticuerpo anti IgG de perro, se midió mediante ELISA el título de los anticuerpos IgG de los sueros que reaccionan de forma específica con la proteína recombinante.

Del mismo modo que para la inmovilización de la proteína preparada en una fase sólida, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución de la proteína recombinante diluida hasta 50 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato a una placa de 96 pocillos Immobilizer Amino (fabricada por Nunc), y se dejó reposar la placa a 4 °C durante una noche. Del mismo modo que para el bloqueo, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de tampón bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,3) que contenía BSA al 0,5 % (seroalbúmina bovina, fabricada por Sigma Aldrich Japón), (en lo sucesivo denominado en este documento como solución de bloqueo), y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El suero se diluyó 500 veces con la solución de bloqueo, y se añadieron a la placa 100 µl/pocillo del suero diluido, seguido de la agitación de la placa a temperatura ambiente durante 3 horas para dejar que transcurra la reacción. Tras 3 lavados de los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (fabricado por Wako Pure Chemicals) (en lo sucesivo denominado en este documento como PBS-T), se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de anticuerpo de IgG de perro conjugado con HRP (cabra anti IgG-h+I de perro conjugado con HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) diluido 3.000 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de un sustrato de HRP, TMB (TMB (tetrametilbencidina) 1-Step Turbo, fabricado por PIERCE), y se dejó que transcurra la reacción enzima-sustrato a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, se finalizó la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de solución de ácido sulfúrico 0,5 M (fabricada por Sigma Aldrich Japón), y después se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Como control, se midieron de la misma manera que anteriormente una placa en la que la proteína recombinante preparada no estaba inmovilizada y una placa con la que el suero procedente de un perro portador de cáncer no reaccionó.

Entre el total de 486 muestras utilizadas en el diagnóstico del cáncer descrito anteriormente, 311 muestras se diagnosticaron de forma definitiva como malignas mediante el diagnóstico patológico utilizando el tejido tumoral extirpado.

De forma específica, las muestras se diagnosticaron como cáncer tal como melanoma maligno; tumor mixto maligno; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células basales; epulis acantomatoso; tumor intraoral; adenocarcinoma perianal; tumor de la glándula anal; carcinoma apocrino de la glándula anal; tumor de células de Sertoli; cáncer de vulva; adenocarcinoma sebáceo; epitelioma sebáceo; adenoma sebáceo; carcinoma de las glándulas sudoríparas; adenocarcinoma intranasal; adenocarcinoma nasal; cáncer de tiroides; cáncer de colon; adenocarcinoma bronquial; adenocarcinoma; carcinoma ductal; adenocarcinoma mamario; adenocarcinoma mamario combinado; tumor mixto maligno de glándulas mamarias; adenocarcinoma papilar intraductal; fibrosarcoma; hemangiopericitoma; osteosarcoma; condrosarcoma; sarcoma de tejidos blandos; sarcoma histiocítico; mixosarcoma; sarcoma indiferenciado; cáncer de pulmón; mastocitoma; liomioma cutáneo; liomioma intra abdominal; liomioma; carcinoma de células escamosas; leucemia linfocítica crónica; linfoma; linfoma gastrointestinal; linfoma de órganos digestivos; linfoma de células pequeñas o de células medianas; tumor adrenomedular; tumor de las células de la granulosa; feocromocitoma; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales); inflamación supurante; tumor de hígado intra abdominal; cáncer de hígado; plasmocitoma; hemangiopericitoma maligno; angiosarcoma; adenocarcinoma de la glándula anal; cáncer oral; melanoma maligno metastásico; melanoma maligno amelanico; melanoma maligno cutáneo; mioepitelioma maligno; seminoma maligno; seminoma; adenocarcinoma del intestino grueso; adenocarcinoma gástrico; carcinoma sebáceo de escasa malignidad; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma apocrino; carcinoma de las glándulas sudoríparas apocrino poco diferenciado; histiocitoma fibroso maligno; mieloma múltiple; tumor maligno mesenquimatoso; liposarcoma; osteosarcoma; sarcoma idiopático; sarcoma de partes blandas (tumor de células fusiformes); sarcoma poco diferenciado; sarcoma sinovial; angiosarcoma; epitelioma maligno metastásico; adenocarcinoma mamario tubular; carcinoma ductal mamario; cáncer de mama inflamatorio; leucemia; tricopitelioma invasivo; linfoma de células medianas; linfoma multicéntrico; osteosarcoma (glándula mamaria); mastocitoma (de tipo II según Patnaik); mastocitoma (de grado II); liomiosarcoma o similares.

Como se muestra en la Fig. 3, los sueros procedentes de estos perros portadores de cáncer mostraron un título de anticuerpo significativamente elevado frente a la proteína recombinante. Se reveló que, mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que mostraba el doble del valor promedio de las muestras de caninos, se pudieron diagnosticar de forma satisfactoria como malignas 192 muestras, es decir el 61,7 % de los casos malignos. Los detalles de estas 192 muestras de cáncer son como sigue. Cabe señalar que el siguiente número de cada caso de cáncer es un total acumulativo dado que algunas muestras contienen primarios múltiples.

Melanoma maligno, 10 casos; linfoma, 9 casos; feocromocitoma, 1 caso; tumor de las células de la granulosa, 1 caso; carcinoma hepatocelular, 3 casos; angioma, 1 caso; tumor testicular maligno, 9 casos; tumor intraoral, 4 casos; adenocarcinoma perianal, 7 casos; osteosarcoma, 3 casos; fibrosarcoma, 8 casos; carcinoma ductal, 19 casos; condrosarcoma, 1 caso; adenocarcinoma mamario, 35 casos; adenocarcinoma mamario combinado, 24 casos; cáncer de pulmón, 1 caso; adenocarcinoma sebáceo, 2 casos; adenocarcinoma nasal, 2 casos; mastocitoma, 26 casos; tumor adrenomedular, 1 caso; liomiosarcoma, 2 casos; carcinoma de células escamosas, 7 casos; leucemia linfocítica crónica, 1 caso; sarcoma indiferenciado, 1 caso; tumor mixto maligno, 2 casos; hemangiopericitoma, 1 caso; tumor en la articulación de la rodilla izquierda, 1 caso; tumor en el segmento posterior del lóbulo izquierdo del pulmón, 1 caso; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales), 1 caso; sarcoma de partes blandas (tumor de células fusiformes), 1 caso; adenocarcinoma ceruminoso, 1 caso; linfoma multicéntrico, 2 casos; liposarcoma, 1 caso; sarcoma sinovial, 1 caso; tricoepitelioma invasivo, 1 caso; adenocarcinoma de la glándula anal, 1 caso.

El método de diagnóstico descrito anteriormente también se llevó a cabo utilizando muestras de efusión pleural y muestras de ascitis recolectadas de perros con cáncer terminal. Como resultado, se pudieron detectar valores similares a los detectados en las muestras de suero, y por lo tanto se pudo lograr el diagnóstico del cáncer de forma satisfactoria.

Además, se confirmó que las estrategias de diagnóstico tales como el diagnóstico de cánceres que existen en una parte invisible del cuerpo, la evaluación de la fase y el grado del cáncer, el seguimiento de pacientes posquirúrgicos, el diagnóstico de la reaparición y metástasis, y similares también puede lograrse mediante la aplicación del método de diagnóstico descrito anteriormente. Los siguientes son varios de los ejemplos prácticos del diagnóstico detallado mostrado en la Fig. 4.

#### (2)-1 Diagnóstico de tumores invisibles

En el Paciente Canino 1 (Cobrador de pelo liso), el 7 de junio de 2007 no se encontró ningún tumor. Pero aproximadamente 20 días más tarde, el 24 de junio de 2007, se encontró un tumor pedunculado con un diámetro de 2 mm en la encía en la base del colmillo. El día que se lo encontró se ligó el tumor en su parte pedunculada y se escindió. La absorbancia a 450 nm observada antes de que el tumor se hiciera visible a simple vista era de 0,32, lo que era significativamente elevado y no muy diferente de la absorbancia en el momento del hallazgo del tumor, 0,37. El resultado indica que mediante el método de la presente invención es posible diagnosticar cánceres incluso en una parte invisible, tal como una parte intraperitoneal.

Se observó una elevación del valor antes de que el tumor se hiciera visible a simple vista, lo que se considera que fue un signo de desarrollo tumoral. Por lo tanto, el método de la presente invención es útil en los exámenes médicos tales como las revisiones médicas periódicas.

2 semanas tras la escisión tumoral, se examinó otra vez al Paciente Canino 1 mediante serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm disminuyó enormemente, hasta 0,07. Por lo tanto, también se confirmó que el tumor que expresaba antígeno de cáncer que había provocado el título de anticuerpos aumentado se había eliminado de forma completa (véase, (2)-4, Seguimiento de pacientes posquirúrgicos).

#### (2)-2 Evaluación de la fase de la evolución del cáncer

La fase de la evolución del cáncer se determinó a base del tamaño o de la profundidad del tumor, en qué medida el tumor ejerce influencia en los tejidos circundantes, si el tumor produce metástasis o no, y similares. Se reveló en el presente documento que el valor detectado es más elevado que antes de que se produjera la metástasis, es decir, el cáncer ha avanzado. El siguiente es otro ejemplo de la evaluación de la fase de un determinado caso de cáncer, el cual recibió terapia con fármaco antineoplásico.

El 13 de octubre de 2006 se sometió al Paciente Canino 2 (raza mixta) a la extirpación del tumor amputando la pata trasera derecha. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado, este era un mastocitoma elevadamente maligno de Grado II, más bien cercano al Grado III. El 12 de marzo de 2007 se encontró metástasis y reaparición en la ingle derecha y el hígado, y se inició la terapia con fármaco antineoplásico (vinblastina y prednisolona) sin intervenciones quirúrgicas. La administración de fármacos antineoplásicos se inició en el momento del hallazgo de la metástasis y la reaparición, y los fármacos se administraron después de eso otra vez a las 1, 2, 4 y 8 semanas. Cada vez que se administraron los fármacos se llevó a cabo el serodiagnóstico, para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,36, 0,37, 0,26, 0,20 y 0,29, respectivamente. Con los fármacos antineoplásicos administrados a intervalos cortos desde el inicio hasta la 4ª semana el valor disminuyó de forma gradual, lo que

indica que pudo suprimirse la evolución del cáncer. Sin embargo, el valor aumentó otra vez en la 8ª semana, cuando había pasado un mes desde la anterior administración, lo que indica que el cáncer comenzó a avanzar otra vez. También se confirmó de forma clínica que esta vez el tumor creció más grande. El resultado obtenido en el Paciente Canino 2 reveló también que mediante este método puede evaluarse la fase de la evolución del cáncer, y que el efecto de la terapia con fármacos antineoplásicos también puede evaluarse como se muestra anteriormente.

(2)-3 Evaluación del grado de malignidad del cáncer

Los basaliomas incluyen el tipo maligno y el tipo benigno. Desde hace un tiempo de acuerdo con la clasificación de la OMS, los basaliomas malignos se llaman carcinomas de células basales y los basaliomas benignos se llaman tricoblastomas.

Se diagnosticó con carcinoma de células basales (maligno) al Paciente Canino 3 (Beagle). En el momento de la cirugía se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,35 mm. Por otro lado, se diagnosticó al Paciente Canino 4 (raza mixta) con tricoblastoma (benigno), el serodiagnóstico llevado a cabo en el momento de la cirugía reveló que la absorbancia a 450 nm era de 0; no se detectó en absoluto. Por lo tanto, incluso en el caso de los mismos basaliomas, el carcinoma de células basales maligno y el tricoblastoma benigno pueden diagnosticarse de forma distintiva.

El próximo ejemplo es en tumores de la glándula mamaria. Los tumores de glándula mamaria incluyen tumores malignos tales como el adenocarcinoma mamario y el tumor mixto maligno de glándula mamaria, y tumores mamarios benignos que no muestran síntomas malignos. El 17 de mayo de 2006 se sometió al Paciente Canino 5 (Yorkie) a la extirpación de un tumor mixto maligno de la glándula mamaria y de un adenocarcinoma mamario. En general, la escisión completa de los tumores mixtos en la glándula mamaria es fácil debido a que son poco invasivos de los tejidos circundantes incluso, si son malignos y, así, el transcurso posquirúrgico de los pacientes habitualmente no tiene incidentes. Sin embargo, se diagnosticó al Paciente Canino 5 con un tumor elevadamente maligno, debido a que el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado reveló que algunos componentes de la muestra de ensayo procedente del Paciente Canino 5 mostraban una naturaleza invasiva. Por otro lado, el adenocarcinoma mamario es un tumor elevadamente invasivo debido a que, con frecuencia, reaparece y produce metástasis. Aunque no se observó invasión de células tumorales en la muestra de ensayo procedente del Paciente Canino 5, se ha señalado que los componentes elevadamente malignos posiblemente proliferaron a otras regiones fuera de la muestra de ensayo. Por lo tanto, los hallazgos en el diagnóstico patológico claramente mostraron que el Paciente Canino 5 padecía cáncer mamario elevadamente maligno. Durante la cirugía se recolectó una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,39. El 28 de enero de 2007 se sometió al Paciente Canino 6 (Yorkshire Terrier) a la extirpación de un tumor mamario. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, la atipia de las células era baja y, por lo tanto, el Paciente Canino 6 se diagnosticó con adenoma mamario benigno sin hallazgos malignos. Durante la cirugía se recolectó una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,05. En los dos casos revelados anteriormente los tumores elevadamente malignos muestran un valor más elevado que los tumores de baja malignidad y los benignos.

(2)-4 Seguimiento de los pacientes posquirúrgicos

El Paciente Canino 7 (Shih Tzu) acudió al hospital debido a un tumor intraoral y el 22 de marzo de 2007 se sometió a la extirpación. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,40. Además, a base del diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, se diagnosticó al Paciente Canino 7 con epulis acantomatoso maligno. Este tipo de tumor con frecuencia reaparece si la escisión es insuficiente, aunque raramente se produce metástasis a distancia. Por lo tanto, es importante si el tumor se puede escindir de forma completa mediante cirugía o no. De acuerdo con el seguimiento el 18 de mayo de 2007, la absorbancia a 450 nm era de 0,25, y por lo tanto el título de anticuerpos disminuyó. La reaparición no se halló hasta agosto de 2007. Por lo tanto, se considera que el valor obtenido en el serodiagnóstico se hizo más bajo que el obtenido en el momento de la cirugía debido a que en el Paciente Canino 7 el tumor pudo escindirse de forma completa.

(2)-5 Diagnóstico de reaparición

El 8 de mayo de 2007 se sometió al Paciente Canino 8 (Husky) a la extirpación de un adenocarcinoma mamario. En el momento de la cirugía se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,08. El diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado reveló que proliferaron células epiteliales atípicas y que principalmente formaron estructuras ductales y, así, este paciente se diagnosticó con adenocarcinoma de mama primario. Dado que muchas células cancerosas ya habían entrado en los vasos linfáticos en ese momento, se dijo que el paciente estaba en elevado riesgo de reaparición o metástasis en los ganglios linfáticos u órganos a distancia. El 28 de junio de 2007, aproximadamente 1 mes y medio tras la cirugía, se encontró metástasis en el mismo sitio. El valor detectado mediante el serodiagnóstico llevado a cabo después era de 0,08, el que no disminuyó en absoluto. Así, se considera que en el Paciente Canino 8 el valor del serodiagnóstico se mantuvo invariable desde principios de mayo hasta fines de junio debido a que no había podido escindirse de forma completa el tumor o a que se habría producido reaparición.

## (2)-6 Diagnóstico de metástasis

Se diagnosticó al Paciente Canino 9 (Scottish Terrier), que de forma repetida había experimentado metástasis y reaparición, con tumor mamario en febrero de 2003; melanoma maligno intraoral en agosto de 2003; melanoma maligno en el labio en enero de 2005 y melanoma intraoral el 13 de abril de 2005, todos los cuales se escindieron mediante cirugía. Este paciente acudió al hospital otra vez el 17 de diciembre de 2006, para el seguimiento tras la reaparición del melanoma intraoral en abril de 2005 y en ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,3. Medio año más tarde, el 20 de junio de 2007, el paciente acudió otra vez al hospital debido a la hipertrofia de los ganglios linfáticos cervicales y malares. En el caso de los linfomas, se observa de forma sistemática la hipertrofia de los ganglios linfáticos. Debido a que el Paciente Canino 9 tenía sólo dos ganglios linfáticos inflamados, se diagnosticó de forma clínica a este paciente como con probable linfoma metastático. El diagnóstico de acuerdo con la presente invención también reveló que era un tumor que había metastatizado a partir del tumor que había existido previamente en este paciente, dado que la absorbancia a 450 nm aumentó enormemente, hasta 0,75.

## (2)-7 Control de la terapia

El 19 de abril de 2007 se sometió al Paciente Canino 11 (Dachshund miniatura) a extirpación tumoral. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado, el paciente padecía adenocarcinoma mamario combinado moderadamente maligno, con una elevada probabilidad de desarrollo invasivo y metastático. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico para revelar que la absorbancia a 450 nm era de 0,26. El 3 de junio de 2008, aproximadamente 1 año tras la extirpación, se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm aumentó enormemente hasta 0,13. Aunque a simple vista no se encontró ningún tumor recurrente, se administró un fármaco antineoplásico (INTERCAT) una vez por semana durante 2 meses para prevenir la reaparición. A las 2, 4 y 6 semanas tras comenzar la administración del fármaco antineoplásico, se llevó a cabo el serodiagnóstico para revelar que la absorbancia a 450 nm era de 0,09, 0,07 y 0,08, respectivamente. Estos resultados obtenidos en el Paciente Canino 11 confirmaron que el valor se hace más bajo que el detectado en un estado portador de cáncer si los tumores se pueden retirar de forma completa, así como que el valor no aumenta si el tratamiento con fármaco antineoplásico previene de forma satisfactoria la metástasis del cáncer y, así, puede seguirse el cambio en los pacientes tratados. Además, también puede llevarse a cabo el diagnóstico de reaparición como se muestra en el Paciente Canino 8, lo que confirma que también puede hacerse posible el control de la terapia.

## (2)-8 Diagnóstico de la malignidad del tumor recurrente

El 27 de abril de 2007 se sometió al Paciente Canino 12 (Chihuahua) a extirpación tumoral. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado, este paciente padecía carcinoma ductal originado a partir del epitelio ductal mamario, es decir, cáncer de mama maligno. El 29 de junio de 2008, aproximadamente 1 año tras eso, el tumor se encontró otra vez y se extirpó. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado, aunque las células tumorales que se originaron a partir del epitelio ductal mamario formaron cavidades glandulares irregulares y se desarrollaron para reduplicarse hacia el lumen, las células constituyentes tenían un núcleo casi uniformemente ovalado y la atipia de las células era bajo y, por lo tanto, el tumor se diagnosticó como adenocarcinoma mamario benigno. Se llevó a cabo el serodiagnóstico pero la absorbancia a 450 nm era de 0,02, casi no se detectó. Los resultados observados en los Pacientes Caninos 8 y 12 confirmaron que el valor del serodiagnóstico no disminuye o se sostiene en los casos en donde el tumor recurrente es maligno, y casi no se detecta en los casos en donde el tumor es benigno.

## (2)-9 Pronóstico del paciente canino portador de un tumor benigno

El 9 de octubre de 2007 se sometió al Paciente Canino 13 (Caniche Toy) a extirpación tumoral. El diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado reveló que las células del epitelio mamario y las células mioepiteliales proliferaron para formar el tumor, pero que ninguna de las dos mostró algún hallazgo maligno y, por lo tanto, este paciente se diagnosticó con tumor mixto benigno. De acuerdo con el serodiagnóstico llevado a cabo en ese momento, la absorbancia a 450 nm era de 0,07, detectada ligeramente. Ocho meses tras eso, el 5 de junio de 2008, se recolectó otra vez una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico, para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0, no se detectó en absoluto. En ese momento no se encontró reaparición de forma clínica. Estos resultados indican que, incluso en el caso en donde el tumor es benigno, la extracción completa del tumor da como resultado el valor disminuido del serodiagnóstico si se puede observar en el estado portador de cáncer un valor detectable, y por lo tanto se puede lograr el pronóstico.

## (3) Diagnóstico en gatos

A continuación, se diagnosticaron gatos que portaban cáncer y gatos sanos. Utilizando la proteína canina recombinante descrita anteriormente y el anticuerpo anti IgG de gato, se midió el título de los anticuerpos IgG de suero felino que reaccionan de forma específica con el polipéptido, de la misma manera que se describe anteriormente. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG de gato conjugado con HRP (FRACCIÓN

IgG de CABRA para IgG de GATO CONJUGADO CON PEROXIDASA (MOLECULA COMPLETA): fabricado por CAPPEL RESERCH REAGENTS) diluido 8.000 veces con la solución de bloqueo.

5 El 17 de agosto de 2005 se sometió al Paciente Felino 1 (Chinchilla) a extirpación tumoral de un adenocarcinoma mamario. La absorbancia a 450 nm fue de 0,32. En el Paciente Felino 2 (Himalayo), al que se sometió a extirpación de carcinoma ductal el 17 de octubre de 2006, la absorbancia a 450 nm fue de 0,18. Por otro lado, no se detectó en absoluto ninguna absorbancia en gatos sanos.

10 Por lo tanto, de forma similar a los perros, se detectó el valor de absorbancia en muestras procedentes de gatos que padecían cáncer, aunque en muestras procedentes de gatos sanos el valor de absorbancia no se detectó en absoluto. Por lo tanto, de forma similar a los perros, utilizando una proteína canina recombinante también pueden detectarse por este método cánceres en gatos.

15 (4) Diagnóstico en seres humanos sanos

Utilizando la proteína canina recombinante descrita anteriormente y el anticuerpo anti IgG de ser humano anterior, se midió del mismo modo que se describe anteriormente el título de anticuerpos IgG de suero de ser humano sano, que reaccionan de forma específica con el polipéptido. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG de ser humano conjugado con HRP (cabra anti IgG (H+L) de ser humano conjugado con HRP: fabricado por Zymed Laboratories) diluido 10.000 veces con la solución de bloqueo. Como control positivo se utilizó un antígeno de ovoalbúmina inmovilizado preparado mediante la inmovilización de ovoalbúmina 50 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato en una fase sólida. Como resultado, en el Ser Humano Sano 1, se observó que la absorbancia a 450 nm en un antígeno de ovoalbúmina era de 0,25, mientras que se observó que la absorbancia a 450 nm en la proteína recombinante era de 0, no se detectó en absoluto. De forma similar, en el Ser Humano Sano 2, la absorbancia a 450 nm observada en un antígeno de ovoalbúmina fue de 0,18, mientras que la absorbancia a 450 nm observada en la proteína recombinante fue de 0, no se detectó en absoluto.

Ejemplo A-4: diagnóstico del cáncer utilizando proteína humana recombinante

30 Utilizando la proteína humana recombinante preparada en el Ejemplo A-2, se midió el título de anticuerpos IgG que reaccionan con la proteína de sueros humanos, caninos y felinos, de la misma manera que en el Ejemplo A-3.

35 El diagnóstico se llevó a cabo utilizando suero de ser humano sano. Del mismo modo que en el Ejemplo A-3 (4), se utilizó como control positivo antígeno de ovoalbúmina. Como resultado, se detectó el valor de absorbancia en el caso en donde la ovoalbúmina estaba inmovilizada sobre una fase sólida, mientras que el valor de absorbancia casi no se detectó en el caso en donde estaba inmovilizada sobre una fase sólida la proteína calmegina humana.

40 De forma similar, en perros y gatos sanos la absorbancia a 450 nm casi no se detectó en el caso en donde la proteína estaba inmovilizada sobre una fase sólida.

Por otro lado, el 21 de junio de 2007 se sometió al Paciente Canino 10 (Shih Tzu) a la extirpación de un adenocarcinoma mamario. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, el tejido de glándula mamaria contenía células invasivas elevadamente atípicas y creció para formar hiperplasia adenomatosa que mostraba estructuras masivas grandes y pequeñas. Por lo tanto, se diagnosticó este paciente como tumor maligno. En este Paciente Canino 10, la absorbancia a 450 nm era de 0,29. El diagnóstico de malignidad se llevó a cabo utilizando 310 muestras de suero adicionales que se habían diagnosticado como malignas a base del diagnóstico patológico. Como resultado, diagnosticando como maligna una muestra que mostraba el doble del valor promedio de las muestras de canino, se pudieron diagnosticar de forma satisfactoria como malignas 189 muestras, es decir el 60,8 % de los casos malignos. Además, en el Paciente Felino 3 (raza mixta), que el 3 de abril de 2007 se sometió a extirpación de un adenocarcinoma mamario, la absorbancia a 450 nm era de 0,14.

Los resultados descritos anteriormente indican que el diagnóstico se puede lograr de forma similar en seres humanos, perros y gatos, incluso utilizando la proteína humana recombinante.

55 Además, las muestras de efusión pleural y de ascitis recolectadas de perros con cáncer terminal se sometieron a diagnóstico utilizando la proteína humana recombinante de la misma manera que la proteína canina recombinante. Como resultado, se pudieron detectar valores similares a los detectados en las muestras de suero y, por lo tanto, se pudo lograr de forma satisfactoria el diagnóstico del cáncer.

60 Ejemplo A-5: diagnóstico del cáncer midiendo el polipéptido antigénico (1)

Se inmunizaron ratones y conejos con el polipéptido canino recombinante preparado en el Ejemplo A-2 para obtener un anticuerpo específico para este antígeno. Utilizando este anticuerpo policlonal, se llevó a cabo mediante ELISA de tipo sándwich la detección del polipéptido antigénico *per se* contenido en el suero procedente de un cuerpo vivo portador de cáncer. Se midió mediante ELISA de tipo sándwich, utilizando anticuerpo anti IgG de ratón, la cantidad de la proteína en el suero que reacciona de forma específica con el anticuerpo policlonal preparado específico para

la proteína.

Del mismo modo que para la inmovilización de un anticuerpo primario en una fase sólida, se añadieron 100 µl/pocillo del antisuero de conejo diluido 20 veces con solución salina tamponada con fosfato a una placa de 96 pocillos  
 5 Immobilizer Amino (fabricada por Nunc) y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Del mismo modo que para el bloqueo, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de tampón de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,3) que contenía BSA al 0,5 % (seroalbúmina bovina, fabricada por Sigma Aldrich Japón), (en lo sucesivo denominada en este documento como solución de bloqueo), y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta  
 10 placa se añadieron 100 µl/pocillo del suero procedente del cuerpo portador de cáncer diluido con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas para dejar que la reacción transcurra. Del mismo modo que para el suero diluido, se prepararon diluciones en serie con factor 10 que variaban de 10 a 1.000 veces. Tras 3 lavados de los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (fabricado por Wako Pure Chemicals) (en lo sucesivo denominado en este documento como PBS-T), se añadieron a  
 15 los mismos 100 µl/pocillo de antisuero de ratón diluido 200 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que la reacción transcurra. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, como anticuerpo terciario se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de anticuerpo de IgG de ratón conjugado con HRP (cabra anti ratón conjugado con HRP estabilizado: fabricado por PIERCE) diluido 2.000 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que la reacción transcurra. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de sustrato de HRP, TMB (TMB  
 20 (tetrametilbencidina) 1-Step Turbo, fabricada por PIERCE), y se dejó que transcurra la reacción enzima-sustrato a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, la reacción se finalizó añadiendo 100 µl/pocillo de solución de ácido sulfúrico 0,5 M (fabricada por Sigma Aldrich Japón), y después se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Como control, se midieron del mismo modo que se describe anteriormente una placa en la que no se inmovilizó antisuero de conejo y una placa con la que no se hizo reaccionar el suero procedente de  
 25 un cuerpo portador de cáncer.

Como resultado, se detectó el polipéptido en perros y gatos que portaban cáncer que padecían liomiosarcoma cutáneo, cáncer de mama, melanoma maligno y similares, mientras que no se detectó el polipéptido en perros sanos, gatos sanos y seres humanos sanos. Por lo tanto, los cánceres pudieron diagnosticarse también mediante  
 30 este método en el que el polipéptido antigénico se detectó con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno el polipéptido canino recombinante.

Ejemplo A-6: diagnóstico del cáncer midiendo el polipéptido antigénico (2)

35 Se inmunizaron ratones y conejos con la proteína humana recombinante preparada en el Ejemplo A-2 para obtener un anticuerpo específico para este antígeno. Del mismo modo que en el Ejemplo 5, la detección del polipéptido antigénico *per se* contenido en el suero procedente de un cuerpo portador de cáncer se llevó a cabo mediante ELISA de tipo sándwich utilizando este anticuerpo policlonal.

40 Como resultado, se detectó el polipéptido en perros y gatos que portaban cáncer que padecían liomiosarcoma cutáneo, cáncer de mama, melanoma maligno y similares, mientras que no se detectó el polipéptido en perros sanos, gatos sanos y seres humanos sanos. Por lo tanto, también podrían diagnosticarse cánceres mediante este método en el que se detectó el polipéptido antigénico con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno el polipéptido humano recombinante.

45 Ejemplo B-1: adquisición de proteínas antigénicas de cáncer nuevas mediante el método SEREX

(1) Preparación de la biblioteca de ADNc

50 Se preparó ARN total de tejido testicular de un perro sano mediante el método de guanidina-fenol-cloroformo, y se purificó el ARN poli(A) utilizando el kit de purificación de ARNm Oligotex-dT30 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) en conformidad con el protocolo adjunto al kit.

55 Utilizando el ARNm obtenido (5 µg) se sintetizó una fagotecas de ADNc de testículo de perro. La preparación de la fagotecas de ADNc se llevó a cabo utilizando el kit de síntesis de ADNc, el kit de síntesis de ZAP-ADNc y el kit de clonación ZAP-ADNc Gigapack III Gold (fabricado por STRATAGENE) en conformidad con los protocolos adjuntos a los kits. El tamaño de la fagotecas de ADNc preparada era de  $1,3 \times 10^6$  ufp/ml.

(2) Exploración de la biblioteca de ADNc con suero

60 Se llevó a cabo la inmunoexploración utilizando la fagotecas de ADNc obtenida de testículo de perro preparada como se describe anteriormente. De forma más particular, se infectaron células *E. coli* hospedadoras (XL1-Blue MRF') con la biblioteca de forma que pudieran aparecer 2.340 clones en una placa de agarosa NZY que tuviera el tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm y se cultivaron a 42 °C durante 3 a 4 horas para dejar que los fagos  
 65 formaran placas. La placa se recubrió con una membrana de nitrocelulosa (Hybond C Extra: fabricada por GE Healthcare Bio-Science) impregnada con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) a 37 °C durante 4 horas para inducir y

expresar proteínas, las cuales se transfectaron así a la membrana. Posteriormente, la membrana se recuperó y se empapó en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 %, seguido de la agitación a 4 °C durante una noche para suprimir reacciones no específicas. Se dejó que este filtro reaccionara con suero de paciente canino diluido 500 veces a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.

5 Al igual que el suero de paciente canino descrito anteriormente, se utilizó suero recolectado de pacientes caninos que padecían tumor próximo al ano. El suero se almacenó a -80 °C y se pretrató inmediatamente antes de su uso. El método de pretratamiento del suero fue como sigue. A saber, se infectaron células *E. coli* hospedadoras (XL1-Blue MRF') con fago  $\lambda$  ZAP Express en el que no se había insertado gen extraño, y después se cultivaron en medio de placa NZY a 37 °C durante una noche. Posteriormente, se añadió a la placa el tampón de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 8,3 que contenía NaCl 0,5 M, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante 15 horas, seguido de la recolección del sobrenadante como un extracto de *E. coli*/fago. Después de eso, se dejó fluir al extracto de *E. coli*/fago recolectado a través de una columna de NHS (fabricada por GE Healthcare BioScience) para inmovilizar en ella las proteínas obtenidas de *E. coli*/fago. Para eliminar anticuerpos adsorbidos en *E. coli* y/o el fago se dejó que el suero procedente de pacientes caninos fluyera y reaccionara con esta columna de proteínas inmovilizadas. La fracción de suero que pasó a través de la columna se diluyó 500 veces con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 % y el diluyente resultante se utilizó como el material para la inmunoexploración.

20 La membrana sobre la que el suero así tratado y la proteína de fusión descrita anteriormente se transfirieron se lavó 4 veces con TBS-T (Tween 20 al 0,05 %/TBS), y se dejó que reaccionara con cabra anti IgG de perro (cabra anti IgG h+1 de perro conjugado con HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) diluido 5.000 veces con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 % como anticuerpo secundario, a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de la detección mediante la reacción de coloración enzimática utilizando la solución de reacción NBT/BCIP (fabricada por Roche). Las colonias en las posiciones en donde se observó una reacción de coloración positiva se recuperaron a partir de la placa de agarosa NZY que tenía el tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm, y se disolvieron en 500  $\mu$ l de tampón SM (NaCl 100 mM, MgClSO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl 50 mM, gelatina al 0,01 %; pH 7,5). La exploración se repitió como una segunda y tercera exploración de la misma manera que se describe anteriormente, hasta que se obtuvo una única colonia positiva para la reacción de coloración, aislando de este modo un clon positivo tras la exploración de 30.940 clones de fagos reactivos con las IgG en el suero.

30 (3) Búsqueda de homología de los genes de antígeno aislados

Para someter al único clon positivo aislado mediante el método descrito anteriormente a un análisis de secuencia de bases, se llevó a cabo un procedimiento de conversión del vector de fago a un vector plasmídico. De formas más particular, se mezclaron 200  $\mu$ l de una solución preparada para contener una *E. coli* hospedadora (XL1-Blue MRF') de forma que la absorbancia DO<sub>600</sub> debía ser de 1,0, con 100  $\mu$ l de una solución de fago purificado y adicionalmente con 1  $\mu$ l de fago auxiliar ExAssist (fabricado por STRATAGENE), y se dejó transcurrir la reacción a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron 3 ml de medio LB a la mezcla de reacción y se cultivó la mezcla a 37 °C durante 2,5 a 3 horas, seguido de la incubación inmediata en un baño de agua a 70 °C durante 20 minutos. Después, se centrifugó la mezcla a 4 °C a 1.000 x g durante 15 minutos, y se recuperó el sobrenadante como una solución de fagémido. Posteriormente, se mezclaron 200  $\mu$ l de una solución preparada para contener un *E. coli* hospedador de fagémido (SOLR), de forma que la absorbancia DO<sub>600</sub> debía ser de 1,0, con 10  $\mu$ l de una solución de fago purificado, y se dejó que transcurra la reacción a 37 °C durante 15 minutos. Después de eso se sembraron en placas 50  $\mu$ l de la mezcla de reacción en medio LB agar que contenía ampicilina (concentración final: 50  $\mu$ g/ml), y se cultivó a 37 °C durante una noche. Se recuperó una única colonia de SOLR transformada y se cultivó en medio LB que contenía ampicilina (concentración final: 50  $\mu$ g/ml) a 37 °C, seguido de la purificación del ADN plasmídico que tenía el inserto de interés utilizando el kit QIAGEN plasmid Miniprep (fabricado por Qiagen).

50 El plásmido purificado se sometió a un análisis de la secuencia del inserto entera mediante el método del cebador en avance, utilizando el cebador T3 descrito en la SEQ ID NO: 5 y el cebador T7 descrito en la SEQ ID NO: 6. Mediante este análisis de secuencia, se obtuvo la secuencia génica descrita en la SEQ ID NO: 15. Utilizando la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de este gen, se llevó a cabo la búsqueda de homología frente a genes conocidos utilizando el programa de búsqueda de homología BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Como resultado, se reveló que el gen obtenido es el gen de la calmegina. El factor homólogo humano del gen de la calmegina canina fue la calmegina humana (homología: secuencia de bases, el 90 %; secuencia de aminoácidos, el 89 %). La secuencia de bases de la calmegina humana se muestra en la SEQ ID NO: 17, y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en la SEQ ID NO: 18.

60 (4) Análisis de la expresión en cada tejido

Se investigó mediante el método de RT-PCR (Transcripción Inversa-PCR) la expresión del gen, que se obtuvo mediante el método descrito anteriormente, en tejidos normales y diversas líneas celulares de perro y ser humano. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo como sigue. A saber, se extrajo ARN total a partir de 50 a 100 mg de cada tejido o de 5 a 10 x 10<sup>6</sup> células de cada línea celular utilizando reactivo TRIZOL (fabricado por Invitrogen), en conformidad con el protocolo adjunto al kit. Utilizando este ARN total se sintetizó ADNc mediante el sistema de síntesis de la primera cadena Superscript para RT-PCR (fabricado por Invitrogen), en conformidad con el

protocolo adjunto al kit. Como con los ADNc procedentes de tejidos normales de ser humano (cerebro, hipocampo, testículo, colon y placenta) se utilizaron ADNc de Gene Pool (fabricado por Invitrogen), ADNc QUICK-Clone (fabricado por CLONTECH) y la biblioteca de ADNc de inserto grande (fabricada por CLONTECH). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo como sigue, utilizando cebadores (descritos en las SEQ ID NO: 19 y 20) específicos para el gen obtenido. A saber, se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 0,25 µl de la muestra preparada mediante la reacción de transcripción inversa, los cebadores anteriores 2 µM, cada uno de los dNTP 0,2 mM y polimerasa ExTaq 0,65 U (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), en un volumen total de 25 µl, y se llevó a cabo la reacción con 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto, utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Los cebadores específicos de gen descritos anteriormente fueron los que amplifican las regiones de las bases 755 a 1318 de la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15 (gen de la calmegina canina) y las bases 795 a 1358 de la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17, y pueden utilizarse para la investigación de la expresión tanto del gen de la calmegina canina como del gen de la calmegina humana. Como control para la comparación, se utilizaron de forma simultánea cebadores (descritos en las SEQ ID NO: 9 y 10) específicos para GAPDH. Como resultado, como se muestra en la Fig. 5, se observó una fuerte expresión en testículo entre los tejidos de perro normales, y por otro lado, se observó una fuerte expresión en las líneas celulares de tumor caninas. Se confirmó la expresión del gen de la calmegina humana solo en testículo entre los tejidos normales, como es el caso con el gen de la calmegina canina, pero se detectó expresión en células de tumor cerebral, de leucemia y de cáncer de esófago, entre las líneas celulares de cáncer. Por lo tanto, también se confirmó que el gen de la calmegina humana se expresa de forma específica en células de testículo y de cáncer.

En la Fig. 5, el número de referencia 1 en las ordenadas indica el patrón de expresión del gen de la calmegina y el número de referencia 2 indica el patrón de expresión del gen *GAPDH* como control para la comparación.

25 Ejemplo B-2: preparación de las proteínas calmegina canina y humana

(1) Preparación de la proteína recombinante

A base del gen de la SEQ ID NO: 15 obtenido en el Ejemplo B-1, se preparó una proteína recombinante mediante el siguiente método. Se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 1 µl del vector que se preparó a partir de la solución de fagémido obtenida en el Ejemplo B-1 y que se sometió al análisis de secuencia, cada uno de los dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción de *Bam*HI y *Eco*RI (descritos en las SEQ ID NO: 21 y 22) 0,4 µM, dNTP 0,2 mM y polimerasa PrimeSTAR HS 1,25 U (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), en un volumen total de 50 µl, y se llevó a cabo la PCR con 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 2 minutos utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Utilizando los dos tipos de cebadores descritos anteriormente se obtuvo la región que codifica la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 16. Tras la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,9 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

El fragmento de ADN purificado se ligó en un vector de expresión pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante y tras eso se recuperaron los plásmidos, seguido de la confirmación mediante secuenciación de que el fragmento génico amplificado coincidía con la secuencia de interés. El plásmido que coincidía con la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick, seguido de la inserción de la secuencia génica de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET30a (fabricado por Novagen) que se había tratado con *Bam*HI y *Eco*RI. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante de fusión etiquetada con His. Con este plásmido se transformó *E. coli* para expresión, BL21 (DE3), y se indujo en *E. coli* la expresión de la proteína de interés con IPTG 1 mM.

A base del gen de la SEQ ID NO: 17 se preparó mediante el siguiente método una proteína recombinante del gen homólogo de ser humano. Se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 1 µl del ADNc preparado en el Ejemplo B-1 cuya expresión pudo confirmarse en diversos tejidos/células mediante el método de RT-PCR, cada uno de los dos tipos de cebadores con los sitios de restricción *Eco*RI y *Xho*I (descritos en las SEQ ID NO: 23 y 24) 0,4 µM, dNTP 0,2 mM y la polimerasa PrimeSTAR HS 1,25 U (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), en un volumen total de 50 µl, y la PCR se llevó a cabo con 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 2 minutos, utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Utilizando los dos tipos de cebadores descritos anteriormente se obtuvo la región codificante de la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 18. Tras la PCR se sometió el ADN amplificado a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,9 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

El fragmento de ADN purificado se ligó en un vector de expresión pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante, y después de eso se recuperaron los plásmidos, seguido de la confirmación mediante secuenciación de que el fragmento génico amplificado coincidía con la secuencia de interés. El plásmido que coincidía con la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xho*I y

se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick, seguido de la inserción de la secuencia génica de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET30a (fabricado por Novagen) que se había tratado con *EcoRI* y *XhoI*. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante etiquetada con His. Con este plásmido se transformó *E. coli* para la expresión, BL21 (DE3), y se indujo la expresión de la proteína de interés en *E. coli* con IPTG 1 mM.

## (2) Purificación de la proteína recombinante

Las células de *E. coli* recombinantes obtenidas anteriormente que expresaban la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 17, respectivamente, se cultivaron en medio LB que contenía kanamicina (concentración final: 30 µg/ml) a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó aproximadamente 0,7, y después se añadió IPTG al mismo de forma que su concentración final debía ser de 1 mM, seguido de su cultivo a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, las células se recolectaron mediante centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos. Se suspendió el sedimento de las células en solución salina tamponada con fosfato y para lavar las células se sometió adicionalmente a centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos.

El sedimento de células *E. coli* obtenido se suspendió en tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) y se trató con ultrasonido en hielo. La solución de *E. coli* tratada con ultrasonido se centrifugó a 6.000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante como la fracción soluble y el precipitado como la fracción insoluble.

La fracción soluble se colocó en una columna de intercambio catiónico (transportador: Sepharose SP (marca registrada) Fast Flow (GE Health Care); volumen de columna: 5 ml, tampón de equilibrado: tampón fosfato 20 mM (pH 7,0)). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) e inmediatamente después se llevó a cabo la elución con un gradiente de densidad de sales mediante tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenía cloruro de sodio 0,3 M-1,0 M. Se recolectaron en cada etapa de la elución seis volúmenes de columna de la fracción eluida.

Entre estas fracciones eluidas, se combinaron todas las fracciones eluidas con tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenía cloruro de sodio 0,3 M y la primera fracción eluida con tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenía cloruro de sodio 1,0 M, y la solución resultante se sometió a purificación adicional mediante una columna secundaria.

Para la columna secundaria se utilizó un transportador de columna Bio gel HT Tipo II (BioRad). El volumen de la columna era de 5 ml. La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna de tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenía cloruro de sodio 0,3 M y las fracciones eluidas descritas anteriormente se colocaron en la columna. Las fracciones que no se adsorbieron en la columna se lavaron con 10 volúmenes de columna de tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenía cloruro de sodio 0,3 M y tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0). Inmediatamente después de eso se llevó a cabo la elución con tampón fosfato 0,2 M (pH 7,0). Se recolectaron en cada etapa de elución seis volúmenes de columna de la fracción eluida. La elución de las proteínas de interés se confirmó mediante tinción de Coomassie llevada a cabo de acuerdo con un método convencional. A base del resultado, las fracciones eluidas se desalaron y concentraron para obtener el material para la fase sólida para el diagnóstico.

## Ejemplo B-3: diagnóstico del cáncer utilizando la proteína calmegina canina

### (1) Diagnóstico del cáncer en perros

Se recolectaron muestras de sangre procedentes de 486 pacientes caninos en los que se encontraron tumores malignos o benignos y de 6 perros sanos, y se separaron los sueros a partir de ellas. Utilizando la proteína calmegina canina preparada en el Ejemplo B-2 y el anticuerpo anti IgG de perro, se midió mediante ELISA el título de anticuerpos IgG de los sueros que reaccionaban de forma específica con la proteína.

Del mismo modo que para la inmovilización de la proteína preparada en una fase sólida, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución de la proteína recombinante diluida a 50 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato a una placa de 96 pocillos Immobilizer Amino (fabricada por Nunc), y se dejó reposar la placa a 4 °C durante una noche. Del mismo modo que para el bloqueo, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de tampón bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,3) que contenía BSA al 0,5 % (seroalbúmina bovina, fabricada por Sigma Aldrich Japón) (denominado en lo sucesivo en este documento como la solución de bloqueo) y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El suero se diluyó 1.000 veces con la solución de bloqueo, y se añadieron a la placa 100 µl/pocillo del suero diluido, seguido de la agitación de la placa a temperatura ambiente durante 3 horas para dejar que transcurra la reacción. Tras 3 lavados de los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (fabricado por Wako Pure Chemicals) (denominado en lo sucesivo en este documento como PBS-T), se añadieron a la misma 100 µl/pocillo de anticuerpo de IgG de perro conjugado con HRP (cabra anti IgG-h+I de perro conjugado con HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) diluido 3.000 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de un sustrato de HRP, TMB (TMB 1-Step Turbo (tetrametilbencidina), fabricado por PIERCE), y se dejó que transcurra la reacción enzima-sustrato a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, se finalizó la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de solución de ácido sulfúrico 0,5 M

(fabricada por Sigma Aldrich Japón) y después se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Como control, se midieron de la misma manera que anteriormente una placa sobre la que no se inmovilizó la proteína recombinante preparada y una placa con la que el suero procedente de un perro que portaba cáncer no reaccionó.

5 Entre el total de 486 muestras utilizadas en el diagnóstico del cáncer descrito anteriormente, 311 muestras se diagnosticaron de forma definitiva como malignas mediante el diagnóstico patológico utilizando el tejido tumoral extirpado.

10 De forma específica, las muestras se diagnosticaron como cáncer tal como melanoma maligno; tumor mixto maligno; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células basales; epulis acantomatoso; tumor intraoral; adenocarcinoma perianal; tumor de la glándula anal; carcinoma apocrino de la glándula anal; tumor de células de Sertoli; cáncer de vulva; adenocarcinoma sebáceo; epitelioma sebáceo; adenoma sebáceo; carcinoma de glándulas sudoríparas; adenocarcinoma intranasal; adenocarcinoma nasal; cáncer de tiroides; cáncer de colon; adenocarcinoma bronquial; adenocarcinoma; carcinoma ductal; adenocarcinoma mamario; adenocarcinoma mamario combinado; tumor mixto maligno de glándula mamaria; adenocarcinoma papilar intraductal; fibrocarcinoma; hemangiopericitoma; osteosarcoma; condrosarcoma; sarcoma de tejidos blandos; sarcoma histiocítico; mixosarcoma; sarcoma indiferenciado; cáncer de pulmón; mastocitoma; liomioma cutáneo; liomioma intra abdominal; liomioma; carcinoma de células escamosas; leucemia linfocítica crónica; linfoma; linfoma gastrointestinal; linfoma de órganos digestivos; linfoma de células pequeñas o de células medianas; tumor adrenomedular; tumor de células de la granulosa; feocromocitoma; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales); inflamación supurante; tumor de hígado intra abdominal; cáncer de hígado; plasmocitoma; hemangiopericitoma maligno; angiosarcoma; adenocarcinoma de glándula anal; cáncer oral; melanoma maligno metastásico; melanoma maligno amelanótico; melanoma maligno cutáneo; mioepitelioma maligno; seminoma maligno; seminoma; adenocarcinoma del intestino grueso; adenocarcinoma gástrico; carcinoma sebáceo de escasa malignidad; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma apocrino; carcinoma de glándulas sudoríparas apocrino poco diferenciado; histiocitoma fibroso maligno; mieloma múltiple; tumor maligno mesenquimatoso; liposarcoma; osteosarcoma; sarcoma idiopático; sarcoma de partes blandas (tumor de células fusiformes); sarcoma poco diferenciado; sarcoma sinovial; angiosarcoma; epitelioma maligno metastásico; adenocarcinoma mamario tubular; carcinoma ductal mamario; cáncer de mama inflamatorio; germinoma; leucemia; tricoepitelioma invasivo; linfoma de células medianas; linfoma multicéntrico; osteosarcoma (glándula mamaria); mastocitoma (de tipo II según Patnaik); mastocitoma (de grado II); liomiosarcoma o similares.

35 Como se muestra en la Fig. 7, los sueros procedentes de estos perros que portaban cáncer mostraron un título de anticuerpo significativamente elevado frente a la proteína recombinante. Se reveló que, mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que mostraba el doble del valor promedio de las muestras de caninos sanos, pudieron diagnosticarse de forma satisfactoria como malignas 177 muestras, es decir el 56,9 % de los casos malignos. Los detalles de estas 177 muestras de cáncer son como sigue. Cabe señalar que el siguiente número de cada caso de cáncer es un total acumulativo, dado que algunas muestras contenían múltiples primarios.

40 Melanoma maligno, 10 casos; linfoma, 10 casos; feocromocitoma, 1 caso; tumor de células de la granulosa, 1 caso; carcinoma hepatocelular, 4 casos; carcinoma de glándula sudorípara, 5 casos; angioma, 1 caso; tumor testicular maligno, 7 casos; tumor intraoral, 4 casos; adenocarcinoma perianal, 11 casos; osteosarcoma, 4 casos; fibrosarcoma, 7 casos; condrosarcoma, 2 casos; adenocarcinoma mamario, 35 casos; adenocarcinoma mamario combinado, 27 casos; cáncer de pulmón, 2 casos; adenocarcinoma sebáceo, 2 casos; adenocarcinoma nasal, 2 casos; mastocitoma, 25 casos; tumor adrenomedular, 1 caso; liomiosarcoma, 1 caso; carcinoma de células escamosas, 5 casos; leucemia linfocítica crónica, 1 caso; germinoma, 1 caso; histiocitoma fibroso maligno, 1 caso; epitelioma maligno metastásico, 1 caso; carcinoma ductal mamario, 1 caso; angiosarcoma, 1 caso; adenocarcinoma mamario tubular, 1 caso; tricoepitelioma invasivo, 1 caso; cáncer de próstata, 1 caso; adenocarcinoma bronquial, 1 caso.

50 El método de diagnóstico descrito anteriormente se llevó a cabo utilizando muestras de efusión pleural y muestras de ascitis recolectadas de perros con cáncer terminal. Como resultado, se pudieron detectar valores similares a los detectados en las muestras de suero, y por lo tanto se pudo lograr de forma satisfactoria el diagnóstico de cáncer.

55 Además, se confirmó que también se pueden lograr aplicando el método de diagnóstico descrito anteriormente las estrategias de diagnóstico tales como el diagnóstico de cánceres que existen en una parte invisible del cuerpo, la evaluación de la fase y el grado del cáncer, el seguimiento de pacientes posquirúrgicos, el diagnóstico de reaparición y metástasis, y similares. Los siguientes son varios de los ejemplos prácticos del diagnóstico detallado mostrado en la Fig. 8.

60 (2)-1 Diagnóstico de tumores invisibles

65 En el Paciente Canino 1 (Cobrador de pelo liso) no se encontró ningún tumor el 7 de junio de 2007. Pero aproximadamente 20 días más tarde, el 24 de junio de 2007, se encontró un tumor pedunculado con un diámetro de 2 mm en la encía en la raíz del colmillo. El tumor se ligó en su parte pedunculada y se escindió el día que se lo encontró. La absorbancia a 450 nm observada antes de que el tumor se hiciera visible a simple vista era de 0,31, la

cual fue significativamente elevada y no muy distinta de la absorbancia en el momento del hallazgo del tumor, 0,33. Este resultado indica que mediante el método de la presente invención es posible diagnosticar cánceres incluso en una parte invisible tal como una parte intraperitoneal.

5 Se observó una elevación del valor antes de que el tumor se hiciera visible a simple vista, lo que se considera que fue un signo del desarrollo tumoral. Por lo tanto, el método de la presente invención es útil en los exámenes médicos tales como la revisión médica periódica.

10 2 semanas después de la escisión tumoral el Paciente Canino 1 se examinó otra vez mediante serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm se redujo enormemente hasta 0,17. Por lo tanto, también se confirmó que el tumor que expresaba antígeno de cáncer que había provocado el título de anticuerpos aumentado se había eliminado de forma completa (véase, (2)-4, Seguimiento de pacientes posquirúrgicos).

15 (2)-2 Evaluación de la fase de la evolución del cáncer

La fase de la evolución del cáncer se determina a base del tamaño o la profundidad del tumor, de cuanta influencia ejerce el tumor sobre los tejidos circundantes, si el tumor produce metástasis o no, y similares. Se reveló en el presente documento que el valor detectado es más elevado que antes si se produce metástasis, es decir, el cáncer ha avanzado. El siguiente es otro ejemplo de una evaluación de la fase de un determinado caso de cáncer, el cual recibió terapia con fármaco antineoplásico.

20

El Paciente Canino 2 (Dachshund miniatura) acudió el 21 de febrero de 2007 al hospital, principalmente con quejas de náuseas y demacración, y se encontraron dos tumores grandes en la cavidad abdominal. El 23 de febrero de 2007 se sometió a este paciente a la extirpación tumoral. El riñón derecho inflamado pesaba 433 g. El nódulo linfático vecino estaba bien vascularizado y pesaba 42 g. A base del diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, se diagnosticó al paciente con linfoma maligno multicéntrico. Se dijo que había una probabilidad de que las células tumorales se propagaran en otros órganos en la cavidad abdominal, dado que se observó propagación diseminada de células tumorales en el tejido adiposo. El 1 de marzo de 2007 se inició la administración de fármaco antineoplásico (Oncovin) de forma posquirúrgica, y se llevó a cabo el serodiagnóstico 3 veces, es decir, el día que se inició la administración, y 2 y 3 meses después de eso. Como resultado, la absorbancia a 450 nm fue 0,18, 0,16, y 0,14, respectivamente. El valor se había reducido de forma gradual desde el inicio de la administración, lo que confirmó que el fármaco antineoplásico tuvo efecto. Por lo tanto, se confirmó que se podía inhibir la evolución del cáncer. Por lo tanto, los resultados en el Paciente Canino 2 confirmaron que también puede evaluarse la fase de la evolución del cáncer. Además, se confirmó que el efecto de la terapia de fármaco antineoplásico también puede evaluarse como se describe anteriormente.

25

30

35

(2)-3 Evaluación del grado de malignidad del cáncer

Los basaliomas incluyen el tipo maligno y el tipo benigno. Desde hace un tiempo, de acuerdo con la nueva clasificación de la OMS, los basaliomas malignos se llaman carcinomas de células basales y los basaliomas benignos se llaman tricoblastomas.

40

El Paciente Canino 3 (Beagle) se diagnosticó con carcinoma de células basales (maligno). En el momento de la cirugía el serodiagnóstico se llevó a cabo para encontrar que la absorbancia a 450 nm era de 0,13. Por otro lado, en el caso del Paciente Canino 4 (raza mixta), diagnosticado con tricoblastoma (benigno), el serodiagnóstico llevado a cabo en el momento de la cirugía reveló que la absorbancia a 450 nm era de 0, no se detectó en absoluto. Por lo tanto, incluso en el caso de los mismos basaliomas, se pueden diagnosticar de forma distintiva el carcinoma de células basales maligno y el tricoblastoma benigno.

45

El próximo ejemplo es de tumores de glándula mamaria. Los tumores de glándula mamaria incluyen tumores malignos tales como el adenocarcinoma mamario y el tumor mixto maligno de glándula mamaria, y tumores mamarios benignos que no muestran síntomas malignos. El 17 de mayo de 2006 el Paciente Canino 5 (Yorkie) se sometió a la extirpación de un tumor mixto maligno de glándula mamaria y de un carcinoma mamario. En general, la escisión completa de los tumores mixtos en la glándula mamaria es fácil debido a que son poco invasivos de los tejidos circundantes, incluso si son malignos y, así, el transcurso posquirúrgico de los pacientes habitualmente es sin incidentes. Sin embargo, se diagnosticó al Paciente Canino 5 con tumor elevadamente maligno, debido a que el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado reveló que algunos componentes de la muestra de ensayo procedente del Paciente Canino 5 mostraron una naturaleza invasiva. Por otro lado, el adenocarcinoma mamario es un tumor elevadamente invasivo que a menudo reaparece y produce metástasis. Aunque no se observó invasión de células tumorales en la muestra de ensayo procedente del Paciente Canino 5, se había señalado que los componentes altamente malignos posiblemente proliferaron en otras regiones fuera de la muestra de ensayo. Por lo tanto, los hallazgos en el diagnóstico patológico claramente mostraron que el Paciente Canino 5 padecía cáncer mamario altamente maligno. Se recolectó una muestra de sangre durante la cirugía y se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,57. Por otro lado, el 28 de enero de 2007 el Paciente Canino 6 (Yorkshire Terrier) se sometió a la extirpación de un tumor mamario. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, la atipia de las células era baja y, por lo tanto, el Paciente

50

55

60

65

Canino 6 se diagnosticó con adenoma mamario benigno sin hallazgos malignos. Se recolectó durante la cirugía una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que la absorbancia a 450 nm era de 0. Los resultados en los dos casos anteriores revelaron que los tumores elevadamente malignos muestran un valor más elevado que los tumores poco malignos, benignos.

5 (2)-4 Seguimiento de los pacientes posquirúrgicos

El Paciente Canino 7 (Shih Tzu) acudió al hospital debido a un tumor intraoral y el 22 de marzo de 2007 se sometió a la extirpación. Después, se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que la absorbancia a 450 nm era de 0,70. Además, a base del diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, se diagnosticó al Paciente Canino 7 con epulis acantomatoso maligno. Este tipo de tumor a menudo reaparece si la escisión es insuficiente, a pesar de que raramente se produce metástasis a distancia. Por lo tanto, es importante si el tumor se puede escindir de forma completa mediante cirugía o no. De acuerdo con el seguimiento del 18 de mayo de 2007, la absorbancia a 450 nm disminuyó a 0,47. No se halló reaparición hasta agosto de 2007. Por lo tanto, se considera que el valor obtenido mediante el serodiagnóstico se hizo más bajo que el valor obtenido en el momento de la cirugía debido a que el tumor pudo escindirse de forma completa del Paciente Canino 7.

(2)-5 Diagnóstico de reaparición

20 El 8 de mayo de 2007 se sometió al Paciente Canino 8 (Husky) a la extirpación de un adenocarcinoma mamario. En el momento de la cirugía se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que la absorbancia a 450 nm era de 0,11. El diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado reveló que las células epiteliales elevadamente atípicas proliferaron y formaron principalmente estructuras ductales, y por lo tanto este paciente se diagnosticó con adenocarcinoma de mama primario. Dado que muchas células cancerosas habían entrado ya en los vasos linfáticos en ese momento se dijo que el paciente tenía un riesgo elevado de reaparición o de metástasis en los ganglios linfáticos o en órganos a distancia. El 28 de junio de 2007, aproximadamente 1 mes y medio después de la cirugía, se encontró metástasis en el mismo sitio. El valor detectado mediante el serodiagnóstico aumentó a 0,12. Por lo tanto, se confirmó que el valor detectado mediante el serodiagnóstico era más elevado a finales de junio que a principios de mayo debido a que el tumor no pudo escindirse de forma completa o a que pudo haberse producido reaparición en el Paciente Canino 8.

35 El 24 de octubre de 2006 se sometió al Paciente Canino 9 (Sheltie) a la extirpación de un carcinoma ductal. El serodiagnóstico llevado a cabo en ese momento reveló que la absorbancia a 450 nm era de aproximadamente 0, casi no detectado. Aproximadamente 3 meses más tarde, el 31 de enero de 2007, este paciente acudió al hospital debido a la reaparición del cáncer y se sometió otra vez a la extirpación. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, muchas células cancerosas que tenían núcleos atípicos ovalados invadieron los vasos linfáticos y se observó metástasis en el ganglio linfático inguinal y así, el paciente se diagnosticó con carcinoma ductal (cáncer de mama) con probabilidad de metástasis a distancia. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que la absorbancia a 450 nm aumentó a 0,10. Por lo tanto, de forma similar a lo anterior, se reveló que el valor del serodiagnóstico aumentó 3 meses más tarde debido a que el tumor no había podido escindirse de forma completa o a que se había producido reaparición del tumor en el Paciente Canino 9.

(2)-6 Diagnóstico de metástasis

45 En febrero de 2003 el Paciente Canino 10 (Scottish Terrier), que experimentaba de forma repetida metástasis y reaparición, se diagnosticó con tumor mamario; en agosto de 2003 con melanoma maligno intraoral; en enero de 2005 con melanoma maligno del labio y el 13 de abril de 2005 con melanoma intraoral, todos los cuales se escindieron mediante cirugía. Este paciente acudió al hospital otra vez el 17 de diciembre de 2006 para el seguimiento tras la recurrencia del melanoma intraoral de abril de 2005, y se llevó a cabo el serodiagnóstico en ese momento para encontrar que la absorbancia a 450 nm era de 0,39. Medio año más tarde, el 20 de junio de 2007, el paciente acudió otra vez al hospital debido a la hipertrofia de los ganglios linfáticos cervicales y malares. En el caso de los linfomas, se observa de forma sistemática la hipertrofia de los ganglios linfáticos. Debido a que el Paciente Canino 10 tenía sólo dos ganglios linfáticos inflamados, este paciente se diagnosticó de forma clínica con probable linfoma metastásico. El diagnóstico de acuerdo con la presente invención también reveló que era un tumor que había metastatizado a partir del tumor que existía previamente en este paciente, dado que la absorbancia a 450 nm aumentó enormemente hasta 0,80.

60 El 11 de marzo de 2006 el Paciente Canino 11 (Shiba Inu) se sometió a la extirpación de un melanoma maligno oral en el labio derecho. Este paciente tiene una historia de tratamiento con fármaco antineoplásico (ciclofosfamida) desde el 10 de junio hasta el 26 de septiembre de 2006, y había recibido desde el 23 de mayo de 2006 BIREMO S, que contiene germanio orgánico como principal componente. El 20 de marzo de 2007 este paciente se sometió a la extirpación de un tumor que se consideró que era metástasis procedente del tumor mencionado anteriormente, y se llevó a cabo el serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm fue 0,06. La base del diagnóstico patológico en ese momento, utilizando el tejido extirpado, se diagnosticó al Paciente Canino 11 con melanoma maligno metastásico. El 27 de junio de 2007, tres meses tras la extirpación del melanoma metastásico, otra vez se produjo metástasis en este paciente. El tumor que se extirpó el 20 de marzo de 2007 estaba presente en la parte

cervical derecha, y esta vez el tumor apareció en el lado contrario. Al igual que la forma del tumor, se formó una masa negra de forma similar al tumor previo. El tumor, que tenía el tamaño de 3,1 x 3,2 x 0,8 cm, también se diagnosticó de forma clínica como metástasis. Se llevó a cabo otra vez el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm aumentó a 0,19, lo que indicó que era un tumor metastásico.

5

#### (2)-7 Control de la terapia

El 19 de abril de 2007 el Paciente Canino 11 (Dachshund miniatura) se sometió a extirpación tumoral. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado el paciente padecía adenocarcinoma mamario combinado moderadamente maligno, con una elevada posibilidad de desarrollo invasivo y metastásico. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que la absorbancia a 450 nm era de 0,30. El 3 de junio de 2008, aproximadamente 1 año después de la extirpación, se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que la absorbancia a 450 nm disminuyó a 0,25. Aunque a simple vista no se encontró ningún tumor recurrente, para prevenir la reaparición se administró un fármaco antineoplásico (INTERCAT) una vez por semana durante 2 meses. Se llevó a cabo el serodiagnóstico a las 2, 4 y 6 semanas tras el inicio de la administración del fármaco antineoplásico para revelar que la absorbancia a 450 nm era de 0,25, 0,19 y 0,19, respectivamente. Estos resultados obtenidos en el Paciente Canino 11 confirmaron que el valor se hace más bajo que el valor detectado en un estado portador de tumor si los tumores se pueden eliminar de forma completa, así como que el valor no aumenta si el tratamiento con fármaco antineoplásico previene de forma satisfactoria la metástasis del cáncer, y de este modo se puede seguir el cambio en los pacientes tratados. Además, el diagnóstico de reaparición también se puede llevar a cabo como se muestra en el Paciente Canino 8, lo que confirma que también se puede hacer posible el control de la terapia.

10

15

20

#### (2)-8 Diagnóstico de malignidad del tumor recurrente

25

El 27 de abril de 2007 el Paciente Canino 12 (Chihuahua) se sometió a extirpación tumoral. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado, este paciente padecía carcinoma ductal originado a partir del epitelio ductal mamario, es decir, cáncer de mama maligno. El 29 de junio de 2008, aproximadamente 1 año después de eso, se encontró otra vez tumor y se extirpó. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado, aunque las células tumorales que se originaban a partir del epitelio ductal mamario formaban cavidades glandulares irregulares y se desarrollaron para reduplicarse hacia el lumen, las células constituyentes tenían un núcleo casi uniformemente ovalado y la atipia de las células era baja, y por lo tanto el tumor se diagnosticó como adenocarcinoma mamario benigno. El serodiagnóstico se llevó a cabo pero la absorbancia a 450 nm fue 0, no se detectó en absoluto. Los resultados observados en los Pacientes Caninos 8 y 12 revelaron que el valor del serodiagnóstico no disminuye o se mantiene en los casos en donde el tumor recurrente es maligno, y no se detecta en los casos en donde el tumor es benigno.

30

35

#### (2)-9 Pronóstico de pacientes caninos portadores de tumor benigno

40

El 9 de octubre de 2007 el Paciente Canino 13 (Caniche Toy) se sometió a extirpación tumoral. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado, las células epiteliales mamarias y las células mioepiteliales proliferaron para formar el tumor, pero ninguna de ellas mostró hallazgos malignos, y por lo tanto se diagnosticó como tumor mixto benigno. El serodiagnóstico mostró el resultado de que la absorbancia a 450 nm era de 0,13, se detectó ligeramente. Ocho meses después de eso, el 5 de junio de 2008, se recolectó otra vez una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que la absorbancia a 450 nm era de 0, no se detectó en absoluto. En ese momento no se encontró reaparición de forma clínica. Estos resultados confirmaron que, incluso en el caso en donde el tumor es benigno, la eliminación completa de los tumores da como resultado el valor disminuido en el serodiagnóstico, si se puede observar un valor detectable en el estado portador de cáncer, y así se puede lograr el pronóstico.

45

50

#### (3) Diagnóstico en gatos

A continuación, se diagnosticaron gatos portadores de cáncer y gatos sanos. Utilizando la proteína calmegina canina descrita anteriormente y el anticuerpo anti IgG de gato se midió el título de anticuerpos IgG de suero felino que reacciona de forma específica con el polipéptido, de la misma manera que se describe anteriormente. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG de gato conjugado con HRP (FRACCIÓN de IgG de CABRA para IgG de GATO CONJUGADO CON PEROXIDASA (MOLECULA COMPLETA): fabricado por CAPPEL RESERCH REAGENTS) diluido 8.000 veces con la solución de bloqueo.

55

60

El 17 de agosto de 2005 el Paciente Felino 1 (Chinchilla) se sometió a extirpación tumoral de un adenocarcinoma mamario. La absorbancia a 450 nm era de 0,22. En el Paciente Felino 2 (Himalayo), que experimentó extirpación de carcinoma ductal el 17 de octubre de 2006, la absorbancia a 450 nm era de 0,21. Por otro lado, no se detectó en absoluto absorbancia en gatos sanos.

65

Por lo tanto, de forma similar a los perros, se detectó valor de absorbancia en muestras procedentes de gatos que padecían cáncer, mientras que no se detectó en absoluto valor de absorbancia en ninguna de las muestras

procedentes de gatos sanos. Por lo tanto, de forma similar a los perros, utilizando una proteína calmegina canina también pueden diagnosticarse mediante este método cánceres en gatos.

(4) Diagnóstico en seres humanos sanos

5 De la misma manera que se describe anteriormente, utilizando la proteína calmegina canina descrita anteriormente y el anticuerpo anti IgG humano anterior se midió el título de anticuerpos IgG de suero de ser humano sano que reaccionan de forma específica con la proteína. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG humanas conjugado con HRP (cabra anti IgG (H+L) humanas conjugado con HRP: fabricado por Zymed Laboratories) diluido  
10 10.000 veces con la solución de bloqueo. Como control positivo se utilizó un antígeno de ovoalbúmina inmovilizado preparado inmovilizando sobre una fase sólida ovoalbúmina 50 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato. Como resultado, en el Ser Humano Sano 1, la absorbancia a 450 nm observada en un antígeno de ovoalbúmina fue de 0,25, mientras que la absorbancia a 450 nm observada en la proteína recombinante fue de 0,03, casi no detectado.

15 Ejemplo B-4: diagnóstico del cáncer utilizando proteína calmegina humana

Utilizando la proteína calmegina humana preparada en el Ejemplo B-2, se midió de la misma manera que en el Ejemplo B-3 el título de anticuerpos IgG de sueros de ser humano, canino y felino que reaccionaban con la proteína.

20 El diagnóstico se llevó a cabo utilizando suero de ser humano sano. De la misma manera que en el Ejemplo B-3 (4), se utilizó como control positivo antígeno de ovoalbúmina. Como resultado, se detectó valor de absorbancia en el caso en donde la ovoalbúmina estaba inmovilizada sobre una fase sólida, mientras que el valor de absorbancia casi no se detectó en el caso en donde estaba inmovilizada proteína calmegina humana sobre una fase sólida.

25 De forma similar, en perros y gatos sanos la absorbancia a 450 nm casi no se detectó en el caso en donde la proteína estaba inmovilizada en una fase sólida.

30 Por otro lado, el 21 de junio de 2007 el Paciente Canino 12 (Shih Tzu) se sometió a extirpación de un adenocarcinoma mamario. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, el tejido de glándula mamaria contenía células invasivas elevadamente atípicas y creció para formar hiperplasia adenomatosa mostrando estructuras masivas grandes y pequeñas. Por lo tanto, este paciente se diagnosticó con tumor maligno. En este Paciente Canino 12, la absorbancia a 450 nm era de 0,70. El diagnóstico de la malignidad se llevó a cabo utilizando 310 muestras de suero que se habían diagnosticado como malignas a base del diagnóstico patológico.  
35 Como resultado, diagnosticando como maligna una muestra que presenta el doble del valor promedio de las muestras de canino sano, pudieron diagnosticarse de forma satisfactoria como malignas 171 muestras, es decir el 55,0 % de los casos malignos. Además, en el Paciente Felino 3 (raza mixta), que se sometió a la extirpación de un adenocarcinoma mamario el 3 de abril de 2007, la absorbancia a 450 nm fue de 0,38.

40 Los resultados descritos anteriormente indican que el diagnóstico puede lograrse de forma similar en seres humanos, perros y gatos, incluso utilizando una proteína calmegina humana.

45 Además, se sometieron al diagnóstico muestras de efusión pleural y de ascitis recolectadas de perros con cáncer terminal utilizando la proteína humana recombinante de la misma manera que la proteína canina recombinante. Como resultado, pudieron detectarse valores similares a los detectados en las muestras de suero, y por lo tanto el diagnóstico del cáncer pudo lograrse de forma satisfactoria.

Ejemplo B-5: diagnóstico del cáncer mediante medición del polipéptido antigénico (1)

50 Se inmunizaron ratones y conejos con la proteína canina recombinante preparada en el Ejemplo B-2 para obtener un anticuerpo específico para este antígeno. Mediante ELISA de tipo sándwich utilizando este anticuerpo policlonal, se llevó a cabo la detección del polipéptido antigénico *per se* contenido en el suero procedente de un cuerpo vivo portador de cáncer. Utilizando el anticuerpo anti IgG de ratón se midió mediante ELISA de tipo sándwich la cantidad de proteína en el suero que reacciona de forma específica con el anticuerpo policlonal preparado específico para la  
55 proteína.

60 Como para la inmovilización de un anticuerpo primario sobre una fase sólida, se añadieron 100 µl/pocillo del antisuero de conejo diluido 20 veces con solución salina tamponada con fosfato a una placa de 96 pocillos Immobilizer Amino (fabricada por Nunc) y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Como para el bloqueo, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de tampón de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,3) que contenía BSA al 0,5 % (seroalbúmina bovina, fabricada por Sigma Aldrich Japón) (denominado en lo sucesivo en este documento como solución de bloqueo), y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de suero procedente del cuerpo portador de cáncer diluido con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas para dejar que transcurra la reacción. Como para el suero diluido,  
65 se preparó una dilución en serie con factor 10 que variaba de 10 a 1.000 veces. Tras lavar 3 veces los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (fabricado por Wako Pure Chemicals)

(denominado en lo sucesivo en este documento como PBS-T), se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de antisuero de ratón diluido 200 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con HRP (cabra anti ratón conjugado con HRP estabilizado: 5 fabricado por PIERCE) como anticuerpo terciario, diluido 2.000 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de un sustrato de HRP, TMB (TMB (tetrametilbencidina) 1-Step Turbo, fabricada por PIERCE), y se dejó que transcurra la reacción de enzima-sustrato a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, se finalizó la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de solución de ácido sulfúrico 10 0,5 M (fabricada por Sigma Aldrich Japón), y después se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Como control, se midió de la misma manera que se describe anteriormente una placa sobre la que no se inmovilizó antisuero de conejo y una placa con la que el suero procedente de un cuerpo portador de cáncer no reaccionó.

15 Como resultado, se detectó el polipéptido en perros portadores de cáncer y en gatos que padecían liomiosarcoma cutáneo, cáncer de mama, melanoma maligno y similares, mientras que no se detectó el polipéptido en perros sanos, gatos sanos y seres humanos sanos. Por lo tanto, los cánceres también podrían diagnosticarse mediante este método en el que el polipéptido antigénico se detectó con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno el polipéptido canino recombinante.

20 Ejemplo B-6: diagnóstico del cáncer midiendo el polipéptido antigénico (2)

25 Se inmunizaron ratones y conejos con la proteína humana recombinante preparada en el Ejemplo B-2 para obtener un anticuerpo específico para este antígeno. De la misma manera que en el Ejemplo B-5, utilizando este anticuerpo policlonal se llevó a cabo mediante ELISA de tipo sándwich la detección del polipéptido antigénico *per se* contenido en el suero procedente de un cuerpo portador de cáncer.

30 Como resultado, el polipéptido se detectó en perros y gatos portadores de cáncer que padecían liomiosarcoma cutáneo, cáncer de mama, melanoma maligno o similares, mientras que el polipéptido no se detectó en perros sanos, gatos sanos y seres humanos sanos. Por lo tanto, los cánceres también podrían diagnosticarse mediante este método en el que el polipéptido antigénico se detectó con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno el polipéptido humano recombinante.

35 Ejemplo C-1: adquisición de una proteína antigénica de cáncer nueva mediante el método SEREX

(1) Preparación de la biblioteca de ADNc

40 Se preparó ARN total procedente de tejido testicular de un perro sano mediante el método de guanidina-fenol-cloroformo, y se purificó el ARN poli(A) utilizando el Kit de purificación de ARNm Oligotex-dT30 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.), en conformidad con el protocolo adjunto al kit.

45 Utilizando el ARNm obtenido (5 µg) se sintetizó una fagoteca de ADNc de testículo de perro. La preparación de la fagoteca de ADNc se llevó a cabo utilizando el kit de síntesis de ADNc, kit de síntesis ZAP-ADNc y el kit de clonación ZAP-ADNc Gigapack III Gold (fabricados por STRATAGENE), en conformidad con los protocolos adjuntos a los kits. El tamaño de la fagoteca de ADNc preparada fue  $1,3 \times 10^6$  ufp/ml.

(2) Exploración de la biblioteca de ADNc con suero

50 Se llevó a cabo la inmunoexploración utilizando la fagoteca de ADNc obtenida de testículo de perro preparada como se describe anteriormente. De forma más particular, se infectaron con la biblioteca células hospedadoras *E. coli* (XL1-Blue MRF') de forma que debían aparecer 2.340 clones sobre una placa de agarosa NZY que tuviera el tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm, y se cultivaron a 42 °C durante 3 a 4 horas para dejar al fago que forme placas. La placa se recubrió con una membrana de nitrocelulosa (Hybond C Extra: fabricada por GE Healthcare Bio-Science) impregnada con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) a 37 °C durante 4 horas para inducir y expresar las 55 proteínas, que se transfirieron así a la membrana. Posteriormente, la membrana se recubrió y empapó en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 %, seguido de su agitación a 4 °C durante una noche para suprimir reacciones no específicas. Se dejó que este filtro reaccionara con suero de paciente canino diluido 500 veces a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.

60 Como con el suero del paciente canino descrito anteriormente, se utilizó suero recolectado procedente de pacientes caninos que padecen carcinoma de células escamosas. El suero se almacenó a -80 °C y se pretrató inmediatamente antes de su uso. El método de pretratamiento del suero fue como sigue. A saber, se infectaron células *E. coli* hospedadoras (XL1-Blue MRF') con fago λ ZAP Express al que no se había insertado ningún gen extraño, y después se cultivaron en medio de placa NZY a 37 °C durante una noche. Posteriormente se añadió a la placa el tampón de 65 NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 8,3 que contenía NaCl 0,5 M y la placa se dejó que repose a 4 °C durante 15 horas, seguido de la recolección del sobrenadante como un extracto de *E. coli*/fago. Después de eso, se dejó que fluya el extracto de

*E. coli*/fago recolectado a través de una columna de NHS (fabricada por GE Healthcare BioScience), para inmovilizar en ella proteínas obtenidas a partir de *E. coli*/fago. Se dejó que el suero procedente de pacientes caninos fluyera a través de y reaccionara con esta columna de proteína inmovilizada, para eliminar anticuerpos adsorbidos en *E. coli* y/o el fago. La fracción de suero que pasó a través de la columna se diluyó 500 veces con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 % y el diluyente resultante se utilizó como el material para la inmunoexploración.

La membrana sobre la que el suero así tratado y la proteína de fusión descrita anteriormente se transfirieron se lavó 4 veces con TBS-T (Tween 20 al 0,05 %/TBS), y se dejó que reaccionara con anti IgG de perro en cabra (cabra anti IgG-h+l de perro conjugado con HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) como anticuerpo secundario, diluido 5.000 veces con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 %, a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de la detección mediante la reacción de coloración enzimática utilizando la solución de reacción NBT/BCIP (fabricado por Roche). Se recuperaron a partir de la placa de agarosa NZY que tenía el tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm las colonias en las posiciones en donde se observó una reacción de coloración positiva y se disolvieron en 500 µl de tampón SM (NaCl 100 mM, MgClSO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl 50 mM, gelatina al 0,01 %; pH 7,5). La exploración se repitió como una segunda y tercera exploración de la misma manera que se describe anteriormente, hasta que se obtuvo una única colonia positiva para la reacción de coloración, aislando de este modo un clon positivo tras la exploración de 30.940 clones de fagos reactivos con las IgG en el suero.

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

Para someter al único clon positivo aislado mediante el método descrito anteriormente a un análisis de secuencia de bases, se llevó a cabo un procedimiento de conversión del vector de fago a un vector plasmídico. De forma más particular, se mezclaron 200 µl de una solución preparada para contener una *E. coli* hospedadora (XL1-Blue MRF<sup>+</sup>) de forma que la absorbancia DO<sub>600</sub> debía ser de 1,0, con 100 µl de una solución de fago purificado y adicionalmente con 1 µl de fago auxiliar ExAssist (fabricado por STRATAGENE), y se dejó que la reacción transcurra a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron a la mezcla de reacción 3 ml de medio LB y se cultivó la mezcla a 37 °C durante 2,5 a 3 horas, seguido de la incubación inmediata en un baño de agua a 70 °C durante 20 minutos. Después, la mezcla se centrifugó a 4 °C a 1.000 x g durante 15 minutos, y se recuperó el sobrenadante como una solución de fagémido. Posteriormente, se preparó una solución de 200 µl para contener una *E. coli* hospedadora de fagémido (SOLR) de forma que la absorbancia DO<sub>600</sub> debía ser de 1,0 cuando se mezclara con 10 µl de una solución de fago purificado, y la reacción se dejó que transcurra a 37 °C durante 15 minutos. Después de eso, se sembraron en placa 50 µl de la mezcla de reacción en medio LB agar que contenía ampicilina (concentración final: 50 µg/ml), y se cultivó a 37 °C durante una noche. Se recuperó una única colonia de SOLR transformada y se cultivó en medio LB que contenía ampicilina (concentración final: 50 µg/ml) a 37 °C, seguido de la purificación del ADN plasmídico que tenía el inserto de interés utilizando el Kit QIAGEN plasmid Miniprep (fabricado por Qiagen).

El plásmido purificado se sometió a un análisis de la secuencia entera del inserto mediante el método del cebador en avance utilizando el cebador T3 descrito en la SEQ ID NO: 5 y el cebador T7 descrito en la SEQ ID NO: 6. Mediante este análisis de secuencia, se obtuvo la secuencia génica descrita en la SEQ ID NO: 25. Utilizando la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de este gen, se llevó a cabo la búsqueda de homología frente a genes conocidos utilizando el programa de búsqueda de homología BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Como resultado, se reveló que el gen obtenido tenía el 99 % de homología (que se calculó solo en la región solapante) con el gen registrado CEP descrito en la SEQ ID NO: 41, en términos de secuencia de bases y de secuencia de aminoácidos, de forma que se determinó que el gen era el gen CEP. El factor homólogo humano obtenido del CEP canino fue el CEP humano (homología con el gen CEP descrito en la SEQ ID NO: 25: secuencia de bases, el 87 %; secuencia de aminoácidos, el 84 %). La secuencia de bases de la CEP humana se muestra en la SEQ ID NO: 27 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en la SEQ ID NO: 28.

### (4) Análisis de la expresión en cada tejido

Se investigó mediante el método de RT-PCR (transcripción inversa-PCR) la expresión del gen, que se obtuvo mediante el método descrito anteriormente, en tejidos normales y diversas líneas celulares de perro y de ser humano. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo como sigue. A saber, se extrajo el ARN total procedente de 50 a 100 mg de cada tejido o de 5 a 10 x 10<sup>6</sup> células de cada línea celular utilizando reactivo TRIZOL (fabricado por Invitrogen), en conformidad con el protocolo adjunto al kit. Utilizando este ARN total, se sintetizó ADNc mediante el sistema de síntesis de la primera cadena Superscript para RT-PCR (fabricado por Invitrogen), en conformidad con el protocolo adjunto al kit. Del mismo modo que con los ADNc procedentes de tejidos normales de ser humano (cerebro, hipocampo, testículo, colon y placenta), se utilizaron el ADNc Gene Pool (fabricado por Invitrogen), el ADNc QUICK-Clone (fabricado por CLONTECH) y la biblioteca de ADNc de inserto grande (fabricada por CLONTECH). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo como sigue, utilizando cebadores (descritos en las SEQ ID NO: 29 y 30) específicos para el gen obtenido. A saber, se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 0,25 µl de la muestra preparada mediante la reacción de transcripción inversa, cada uno de los cebadores anteriores 2 µM, cada uno de los dNTP 0,2 mM y polimerasa ExTaq 0,65 U (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), en un volumen total de 25 µl, y la reacción se llevó a cabo con 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Los cebadores específicos de gen descritos anteriormente fueron los que

amplifican las regiones de las bases 4582 a 5124 de las secuencias de bases de las SEQ ID NO: 25 y 41 (gen *CEP* canino) y las bases 4610 a 5152 de la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27 (gen *CEP* humano), y pueden utilizarse para la investigación de la expresión tanto del gen *CEP* canino como del gen *CEP* humano. Como control para la comparación, se usaron de forma simultánea cebadores (descritos en las SEQ ID NO: 9 y 10) específicos para *GAPDH*. Como resultado, como se muestra en la Fig. 9, se observó en testículo una fuerte expresión del gen *CEP* canino entre los tejidos de perro normal y, por otro lado, se observó una fuerte expresión en la línea celular de cáncer de mama canina. La expresión del gen *CEP* humano se confirmó, como es el caso con el gen *CEP* canino, solo en testículo entre los tejidos normales humanos, pero, entre las líneas celulares de cáncer humanas, se detectó expresión en células de tumor cerebral, de leucemia y de cáncer de esófago y, especialmente, se observó una fuerte expresión en la línea celular de leucemia. Por lo tanto, también se confirmó que el gen *CEP* humano se expresa de forma específica en testículo y en células cancerosas.

En la Fig. 9, el número de referencia 1 en las ordenadas indica el patrón de expresión del gen *CEP* y el número de referencia 2 indica el patrón de expresión del gen *GAPDH* como control para la comparación.

Ejemplo C-2: preparación de los polipéptidos obtenidos de las *CEP* canina y humana

(1) Preparación de la proteína recombinante

A base del gen de la SEQ ID NO: 25 obtenido en el Ejemplo C-1, se preparó una proteína recombinante mediante el siguiente método. Se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 1 µl del vector que se preparó a partir de la solución de fagémido obtenida en el Ejemplo C-1 y que se sometió al análisis de secuencia, cada uno de los dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción de *Bam*HI y *Sal*I (descritos en las SEQ ID NO: 31 y 32) 0,4 µM, los dNTP 0,2 mM y polimerasa PrimeSTAR HS 1,25 U (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), en un volumen total de 50 µl, y se llevó a cabo la PCR con 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 7 minutos utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Utilizando los dos tipos de cebadores descritos anteriormente se obtuvo una región que codifica una región de aminoácidos (SEQ ID NO: 35) de los aminoácidos 1514 a 2339 de la SEQ ID NO: 26. Tras la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 %, y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,5 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

De la misma manera, para obtener la región que codifica la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 26 se llevó a cabo la PCR utilizando dos tipos de cebadores, descritos en las SEQ ID NO: 37 y 38. Tras la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 %, y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 7,0 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

Además, para obtener la región que codifica la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 42 se llevó a cabo la PCR utilizando dos tipos de cebadores, descritos en las SEC ID NO: 37 y 43. Tras la PCR, el ADN purificado se sometió a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 %, y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 7,8 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

Cada uno de los fragmentos de ADN purificado se ligó en un vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante y después de eso se recuperaron los plásmidos, seguido de la confirmación por secuenciación de que el fragmento génico amplificado coincide con la secuencia de interés. El plásmido que coincide con la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I, y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick, seguido de la inserción de la secuencia génica de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET30a (fabricado por Novagen) que se había tratado con *Bam*HI y *Sal*I. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante de fusión etiquetada con His. Para la expresión en *E. coli*, se transformó BL21 (DE3) con este plásmido y se indujo en *E. coli* la expresión de la proteína de interés con IPTG 1 mM.

Además, a base del gen de la SEQ ID NO: 27, se preparó mediante el siguiente método una proteína recombinante del gen homólogo humano. Se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 1 µl del ADNc preparado en el Ejemplo C-1, cuya expresión en diversos tejidos/células pudo confirmarse mediante el método de RT-PCR, cada uno de los dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción *Bam*HI y *Sal*I (descritos en las SEQ ID NO: 33 y 34) 0,4 µM, los dNTP 0,2 mM y la polimerasa PrimeSTAR HS 1,25 U (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), en un volumen total de 50 µl, y se llevó a cabo la PCR con 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 7 minutos, utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Utilizando los dos tipos de cebadores descritos anteriormente, se obtuvo una región que codifica una región de aminoácidos (SEQ ID NO: 36) de los aminoácidos 1513 a 2325 de la SEQ ID NO: 28. Tras la PCR, se sometió al ADN amplificado a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 %, y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,5 kpb utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

De la misma manera, para obtener la región que codifica la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 28 se llevó a cabo la PCR utilizando dos tipos de cebadores, descritos en las SEC ID NO: 39 y 40. Tras la PCR, el ADN

amplificado se sometió a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 7,0 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

5 Cada uno de los fragmentos de ADN purificado se ligó en un vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Con el producto de ligamiento resultante se transformó *E. coli* y después de eso se recuperaron los plásmidos, seguido de la confirmación mediante secuenciación de que el fragmento génico amplificado coincidía con la secuencia de interés. El plásmido que coincidía con la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sall*, y se purificó utilizando el kit de extracción en gel QIAquick seguido de la inserción de la secuencia  
10 génica de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET30a (fabricado por Novagen) que se había tratado con *Bam*HI y *Sall*. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante de fusión etiquetada con His. Se transformó con el plásmido *E. coli* para expresión, BL21 (DE3) y se indujo en *E. coli* la expresión de la proteína de interés con IPTG 1 mM.

## 15 (2) Purificación de la proteína recombinante

Las células de *E. coli* recombinantes obtenidas anteriormente que expresaban una parte de la SEQ ID NO: 26 y una parte de la SEQ ID NO: 28, respectivamente, se cultivaron en medio LB que contenía kanamicina (concentración final: 30 µg/ml) a 37 °C hasta que se alcanzó una absorbancia a 600 nm de aproximadamente 0,7, y después se  
20 añadió IPTG al mismo, de forma que su concentración final debía ser 1 mM, seguido de su cultivo a 30 °C durante 20 horas. Posteriormente, se recolectaron las células mediante centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos. El sedimento de las células se suspendió en solución salina tamponada con fosfato y, adicionalmente, para lavar las células se sometió a centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos.

Las células se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato y se trataron por ultrasonido en hielo. La solución de *E. coli* tratada con ultrasonido se centrifugó a 7.000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante como la fracción soluble y el precipitado como la fracción insoluble. La fracción insoluble se suspendió en solución de Tritón X-100 al 4 % y la suspensión resultante se centrifugó a 7.000 rpm durante 20 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces y se llevó a cabo un procedimiento de eliminación de proteasas. El residuo se suspendió en tampón fosfato 100 mM, Tris-HCl 10 mM, que contenía urea 8 M (fabricada por Sigma Aldrich Japón)  
30 (en lo sucesivo en este documento denominado como solución de urea 8 M) y una solución cóctel inhibidora de proteasas, y la suspensión resultante se dejó reposar a 4 °C durante 15 horas para desnaturalizar proteínas.

Después de eso se centrifugó la suspensión a 7.000 rpm durante 20 minutos y la fracción soluble resultante se colocó en una columna quelante de níquel preparada mediante un método convencional (transportador: Chelating Sepharose (marca registrada) Fast Flow (GE Health Care), volumen de columna: 5 ml, tampón de equilibrio: solución de urea 8 M), seguido de dejarlo reposar a 4 °C durante una noche. El sobrenadante se recuperó de este transportador de columna mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos, y el transportador de columna se suspendió en solución salina tamponada con fosfato seguido del relleno de la columna con la suspensión resultante. La fracción que no se adsorbió a la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de solución de urea 8 M,  
40 10 volúmenes de columna de tampón acetato 0,1 M que contenía cloruro de sodio 0,5 M (pH 5,0) y tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía imidazol 10 mM, y la elución se llevó a cabo de forma inmediata con un gradiente de densidad de 5 etapas de imidazol 100 mM-500 mM. En cada etapa de elución se recolectaron cinco volúmenes de columna de la fracción eluida. La elución de las proteínas de interés se confirmó mediante tinción de Coomassie llevada a cabo de acuerdo con un método convencional. A base del resultado se desalaron y concentraron las fracciones eluidas para obtener el material para ser la fase sólida para el diagnóstico.

De la misma manera se cultivaron las células de *E. coli* recombinantes que expresaban respectivamente las SEQ ID NO: 26, 28 y 42 de longitud completa, y se purificaron las proteínas de interés para obtener el material a ser la fase sólida para el diagnóstico.

50 Ejemplo C-3: diagnóstico del cáncer utilizando el polipéptido obtenido de CEP canina

### (1) Diagnóstico del cáncer en perros

55 Se recolectaron muestras de sangre procedentes de 486 pacientes caninos en los que se encontraron tumores malignos y benignos, y de 6 perros sanos, y se separaron los sueros de las mismas. Utilizando el polipéptido parcial de la CEP canina (SEQ ID NO: 35; región de aminoácidos 1514 a 2339 de la SEQ ID NO: 26) preparado en el Ejemplo C-2 y el anticuerpo anti IgG de perro, se midió mediante ELISA el título de anticuerpo IgG del suero que reaccionaba de forma específica con el polipéptido.

60 De la misma manera que para la inmovilización de la proteína preparada sobre una fase sólida, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución de la proteína recombinante diluida hasta 50 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato a una placa de 96 pocillos Immobilizer Amino (fabricada por Nunc), y la placa se dejó reposar a 4 °C durante una noche. Del mismo modo que para el bloqueo, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de tampón bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,3) que contenía BSA al 0,5 % (seroalbúmina bovina, fabricada por Sigma Aldrich Japón)  
65 (denominado en lo sucesivo en este documento como solución de bloqueo), y la placa se agitó a temperatura

ambiente durante 1 hora. La muestra de suero se diluyó 500 veces con la solución de bloqueo y se añadieron a la placa 100 µl/pocillo del suero diluido, seguido de la agitación de la placa a temperatura ambiente durante 3 horas para dejar que transcurra la reacción. Tras 3 lavados de los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (fabricado por Wako Pure Chemicals) (en lo sucesivo denominado en este documento como PBS-T), se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de anticuerpo anti IgG de perro conjugado con HRP (cabra anti IgG-h+I de perro conjugado con HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) diluido 3.000 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que la reacción transcurra. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de un sustrato de HRP, TMB (tetrametilbencidina) (TMB 1-Step Turbo, fabricado por PIERCE), y se permitió que transcurra la reacción enzima-sustrato a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso se finalizó la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de solución de ácido sulfúrico 0,5 M (fabricada por Sigma Aldrich Japón) y después se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Como control, se midió de la misma manera que anteriormente una placa sobre la que no se inmovilizó la proteína recombinante preparada y una placa con la que el suero procedente de un perro portador de cáncer no reaccionó.

Entre el total de 486 muestras utilizadas en el diagnóstico del cáncer descrito anteriormente, 311 muestras se diagnosticaron de forma definitiva como malignas mediante diagnóstico patológico utilizando el tejido tumoral extirpado.

De forma específica, las muestras se diagnosticaron como cáncer, tal como melanoma maligno; tumor mixto maligno; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células basales; epulis acantomatoso; tumor intraoral; adenocarcinoma perianal; tumor de la glándula anal; carcinoma apocrino de la glándula anal; tumor de células de Sertoli; cáncer de vulva; adenocarcinoma sebáceo; epitelioma sebáceo; adenoma sebáceo; carcinoma de glándulas sudoríparas; adenocarcinoma intranasal; adenocarcinoma nasal; cáncer de tiroides; cáncer de colon; adenocarcinoma bronquial; adenocarcinoma; carcinoma ductal; adenocarcinoma mamario; adenocarcinoma mamario combinado; tumor mixto maligno de glándulas mamarias; adenocarcinoma papilar intraductal; fibrosarcoma; hemangiopericitoma; osteosarcoma; condrosarcoma; sarcoma de tejidos blandos; sarcoma histiocítico; mixosarcoma; sarcoma indiferenciado; cáncer de pulmón; mastocitoma; liomioma cutáneo; liomioma intra abdominal; liomioma; carcinoma de células escamosas; leucemia linfocítica crónica; linfoma; linfoma gastrointestinal; linfoma de órganos digestivos; linfoma de células pequeñas o células medianas; tumor adrenomedular; tumor de células de la granulosa; feocromocitoma; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales); inflamación supurante; tumor de hígado intra abdominal; cáncer de hígado; plasmocitoma; hemangiopericitoma maligno; angiosarcoma; adenocarcinoma de la glándula anal; cáncer oral; melanoma maligno metastásico; melanoma maligno amelanítico; melanoma maligno cutáneo; mioepitelioma maligno; seminoma maligno; seminoma; adenocarcinoma del intestino grueso; adenocarcinoma gástrico; carcinoma sebáceo de escasa malignidad; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma apocrino; carcinoma de glándulas sudoríparas apocrino poco diferenciado; histiocitoma fibroso maligno; mieloma múltiple; tumor maligno mesenquimatoso; liposarcoma; osteosarcoma; sarcoma de origen desconocido; sarcoma de partes blandas (tumor de células fusiformes); sarcoma poco diferenciado; sarcoma sinovial; angiosarcoma; epitelioma maligno metastásico; adenocarcinoma mamario tubular; carcinoma ductal mamario; cáncer de mama inflamatorio; germinoma; leucemia; tricoepitelioma invasivo; linfoma de células medianas; linfoma multicéntrico; osteosarcoma (glándula mamaria); mastocitoma (de tipo II según Patnaik); mastocitoma (de grado II); liomiosarcoma o similares.

Como se muestra en la Fig. 11, los sueros procedentes de estos perros portadores de cáncer mostraron un título de anticuerpos significativamente elevado frente a la proteína recombinante. Se reveló que, mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que mostraba el doble del valor promedio de las muestras de canino sano, pudieron diagnosticarse de forma satisfactoria como malignas 197 muestras, es decir el 63,3 % de los casos malignos. Los detalles de estas 197 muestras de cáncer son como sigue. Cabe señalar que el siguiente número de cada caso de cáncer es un total acumulativo, dado que algunas muestras contenían múltiples primarios.

Melanoma maligno, 8 casos; linfoma, 9 casos; feocromocitoma, 1 caso; inflamación supurante, 1 caso; tumor de células de la granulosa, 1 caso; carcinoma hepatocelular, 5 casos; angioma, 1 caso; tumor testicular maligno, 6 casos; tumor intraoral, 5 casos; adenocarcinoma perianal, 12 casos, osteosarcoma, 4 casos; fibrosarcoma, 8 casos; carcinoma ductal, 10 casos; condrosarcoma, 2 casos; adenocarcinoma mamario, 35 casos; adenocarcinoma mamario combinado, 24 casos; cáncer de pulmón, 2 casos; adenocarcinoma sebáceo, 2 casos; adenocarcinoma nasal, 2 casos; mastocitoma, 24 casos; tumor adrenomedular, 1 caso; liomiosarcoma, 1 caso; carcinoma de células escamosas, 4 casos; leucemia linfocítica crónica, 1 caso; sarcoma indiferenciado, 1 caso; tumor mixto maligno, 1 caso; tumor en el segmento posterior del lóbulo izquierdo del pulmón, 1 caso; tumor en la región infra axilar derecha, 1 caso; tumor en el codo de la pata delantera derecha, 1 caso; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales), 1 caso; melanoma maligno metastásico, 3 casos; melanoma maligno amelanítico, 1 caso; adenocarcinoma del intestino grueso, 1 caso; plasmocitoma, 1 caso; sarcoma histiocítico, 1 caso; liposarcoma, 1 caso; sarcoma poco diferenciado, 1 caso; sarcoma sinovial, 1 caso; hemangiopericitoma maligno, 1 caso; carcinoma de glándulas sudoríparas apocrinas, 3 casos; adenocarcinoma bronquial, 1 caso.

El método diagnóstico descrito anteriormente también se llevó a cabo utilizando muestras de efusión pleural y muestras de ascitis recolectadas de perros con cáncer terminal. Como resultado, se pudieron detectar valores

similares a los detectados en las muestras de suero y, por lo tanto, se pudo lograr de forma satisfactoria el diagnóstico del cáncer.

5 Además, se confirmó que también pueden lograrse aplicando el método diagnóstico descrito anteriormente las estrategias diagnósticas tales como el diagnóstico de cánceres que existen en una parte invisible del cuerpo, la evaluación de la fase y el grado del cáncer, el seguimiento de los pacientes postquirúrgicos, el diagnóstico de reaparición y metástasis, y similares. Los siguientes son varios de los ejemplos prácticos del diagnóstico detallado mostrado en la Fig. 12.

10 (2)-1 Diagnóstico de tumores invisibles

El 7 de junio de 2007 no se encontró ningún tumor en el Paciente Canino 1 (Cobrador de pelo liso). No obstante aproximadamente 20 días más tarde, el 24 de junio de 2007, se encontró un tumor pedunculado con un diámetro de 2 mm en la encía en la raíz del colmillo. El tumor se ligó en su parte pedunculada y se escindió el día que se lo  
15 encontró. La absorbancia a 450 nm observada antes de que el tumor se haga visible a simple vista fue de 0,41, lo que era significativamente elevado y no muy distinta de la absorbancia en el momento del hallazgo del tumor, 0,43. El resultado indica que, mediante el método de la presente invención, es posible diagnosticar cánceres incluso en una parte invisible tal como una parte intraperitoneal.

20 La elevación del valor se observó antes de que el tumor se haga visible a simple vista, lo que se considera que fue un signo del desarrollo tumoral. Por lo tanto, el método de la presente invención es útil en los exámenes médicos tales como la revisión de salud periódica.

25 Dos semanas después de la escisión tumoral se exploró otra vez al Paciente Canino 1 mediante serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm se redujo enormemente hasta 0,06. Por lo tanto, también se confirmó que el tumor que expresa antígeno del cáncer que había provocado el título aumentado de anticuerpos se eliminó de forma completa (véase (2)-4, Seguimiento de pacientes postquirúrgicos).

30 (2)-2 Evaluación de la fase de la evolución del cáncer

La fase de la evolución del cáncer se determina a base del tamaño o profundidad del tumor, de cuanta influencia ejerce el tumor sobre los tejidos circundantes, de si el tumor produce metástasis o no, y similares. Se reveló en el presente documento que el valor detectado es más elevado que antes de que se produzca la metástasis, es decir, el  
35 cáncer ha avanzado. El siguiente es otro ejemplo de una evaluación de la fase de un determinado caso de cáncer que recibió terapia con fármaco antineoplásico.

El 21 de febrero de 2007 el Paciente Canino 2 (Dachshund miniatura) acudió al hospital principalmente con quejas de náuseas y de extenuación, y se encontraron dos tumores masivos en la cavidad abdominal. El 23 de febrero de 2007 este paciente se sometió a extirpación tumoral. El riñón derecho inflamado pesaba 433 g. El ganglio linfático vecino estaba bien vascularizado y pesaba 42 g. A base del diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, el  
40 paciente se diagnosticó con linfoma maligno multicéntrico. Se dijo que había una probabilidad de que las células tumorales se propagaran en otros órganos en la cavidad abdominal, dado que se observó una propagación diseminada de células tumorales en el tejido adiposo. El 1 de marzo de 2007 se inició la administración de forma posquirúrgica de fármaco antineoplásico (Oncovin) y se llevó a cabo 3 veces el serodiagnóstico, es decir, en el día  
45 que se inició la administración, y a los 2 y 3 meses después de eso. Como resultado, la absorbancia a 450 nm fue de 0,15, 0,15, y 0,07, respectivamente. El valor había aumentado de forma gradual desde el inicio de la administración, lo que confirmó que el fármaco antineoplásico tuvo efecto. Por lo tanto se confirmó que podía inhibirse la evolución del cáncer. Por consiguiente, los resultados en el Paciente Canino 2 confirmaron que también puede evaluarse la fase de la evolución del cáncer. Además, se confirmó que también puede evaluarse como se describe anteriormente el efecto de la terapia con fármaco antineoplásico.  
50

(2)-3 Evaluación del grado de la malignidad del cáncer

Los basaliomas incluyen el tipo maligno y el tipo benigno. Desde hace un tiempo, de acuerdo con la nueva  
55 clasificación de la OMS, los basaliomas malignos se llaman carcinomas de células basales y los basaliomas benignos se llaman tricoblastomas.

El Paciente Canino 3 (Beagle) se diagnosticó con carcinoma de células basales (maligno). En el momento de la cirugía se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,14. Por otro lado, en el  
60 Paciente Canino 4 (raza mixta), diagnosticado con tricoblastoma (benigno), el serodiagnóstico llevado a cabo en el momento de la cirugía reveló que la absorbancia a 450 nm era de 0, no se detectó en absoluto. Por lo tanto, incluso en el caso de los mismos basaliomas, se pueden diagnosticar de forma distintiva el carcinoma de células basales maligno y el tricoblastoma benigno.

65 El próximo ejemplo es en tumores de glándula mamaria. Los tumores de glándula mamaria incluyen tumores malignos tales como el adenocarcinoma mamario y el tumor mixto maligno de glándula mamaria, y tumores

mamarios benignos que no muestran síntomas de malignidad. El 17 de mayo de 2006 el Paciente Canino 5 (Yorkie) se sometió a la extirpación de un tumor mixto maligno de glándula mamaria y de adenocarcinoma mamario. En general, la escisión completa de los tumores mixtos en la glándula mamaria es fácil debido a que son poco invasivos de los tejidos circundantes incluso si son malignos y, por lo tanto, habitualmente el transcurso postquirúrgico de los pacientes no tiene incidencias. Sin embargo, se había diagnosticado al Paciente Canino 5 con tumor elevadamente maligno, debido a que el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado reveló que algunos componentes de la muestra de ensayo procedente del Paciente Canino 5 mostraban una naturaleza invasiva. Por otro lado, el adenocarcinoma mamario es un tumor altamente invasivo que a menudo reaparece y produce metástasis. Aunque en la muestra de ensayo procedente del Paciente Canino 5 no se observó invasión de células tumorales, se señaló que los componentes elevadamente malignos posiblemente proliferaron a otras regiones fuera de la muestra de ensayo. Por lo tanto, los hallazgos en el diagnóstico patológico muestran claramente que el Paciente Canino 5 padecía cáncer mamario elevadamente maligno. Durante la cirugía se recolectó una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0,57. Por otro lado, el 28 de enero de 2007 el Paciente Canino 6 (Yorkshire Terrier) se sometió a la extirpación de un tumor mamario. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, la atipia de las células era baja y por lo tanto el Paciente Canino 6 se diagnosticó con adenoma mamario benigno, sin hallazgos de malignidad. Durante la cirugía se recolectó una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico, para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0. Los resultados en los dos casos anteriores revelaron que los tumores elevadamente malignos muestran un valor más elevado que los tumores benignos, poco malignos.

#### (2)-4 Seguimiento de los pacientes posquirúrgicos

En agosto de 2003 y el 9 de agosto de 2009 el Paciente Canino 7 (raza mixta) se sometió a la extirpación de un adenoma perianal. El tumor extirpado el 9 de agosto de 2006 se diagnosticó de forma clínica como reaparición, debido a que en el mismo sitio apareció de nuevo un tumor similar. El diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado la segunda vez reveló que las células tumorales eran elevadamente invasivas y atípicas, mostrando anisocariosis y discariosis, y también que se observaba una gran cantidad de núcleos en división. Por lo tanto, se diagnosticó al paciente con tumor maligno. De acuerdo con la patología diagnóstica, es necesario prestar atención a la reaparición local o a la metástasis, las cuales podrían producirse otra vez. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm era de 0,43. El 19 de diciembre de 2006, aproximadamente 4 meses después de la cirugía, en el transcurso del seguimiento se llevó a cabo otra vez el serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm disminuyó a 0,32. No se halló ni reaparición ni metástasis hasta agosto de 2007. Por lo tanto, se considera que en el Paciente Canino 7 el valor obtenido en el serodiagnóstico se hizo más bajo que el obtenido en el momento de la cirugía debido a que el tumor pudo extirparse de forma completa.

#### (2)-5 Diagnóstico de reaparición

El 8 de mayo de 2007 el Paciente Canino 8 (Husky) se sometió a la extirpación de un adenocarcinoma mamario. De acuerdo con el serodiagnóstico llevado a cabo en el momento de la cirugía, la absorbancia a 450 nm era de 0,09. El diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado reveló que proliferaron células epiteliales elevadamente atípicas y formaban principalmente estructuras ductales y, así, este paciente se diagnosticó con adenocarcinoma de mama primario. Se dijo que el paciente estaba en elevado riesgo de reaparición o metástasis en los ganglios linfáticos u órganos a distancia, dado que en ese momento ya habían entrado muchas células cancerosas en los vasos linfáticos. El 28 de junio de 2007, aproximadamente 1 mes y medio después de la cirugía, se encontró metástasis en el mismo sitio. En este momento se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que el valor aumentó a 0,10. Por lo tanto, se confirmó que en el Paciente Canino 8 el valor detectado mediante serodiagnóstico era más elevado hacia finales de junio que a principios de mayo debido que el tumor no había podido escindirse de forma completa o a que se habría producido recurrencia.

El 24 de octubre de 2006 el Paciente Canino 9 (Sheltie) se sometió a extirpación de un carcinoma ductal. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm era de 0,02. Aproximadamente 3 meses después, el 31 de enero de 2007, este paciente acudió al hospital debido a la reaparición del cáncer, y se sometió otra vez a la extirpación. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, muchas células cancerosas que tenían núcleos ovalados atípicos invadieron los vasos linfáticos y se observó metástasis en el ganglio linfático inguinal y, así, el paciente se diagnosticó con carcinoma ductal (cáncer de mama) con una probabilidad de metástasis a distancia. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm aumentó a 0,09. Por lo tanto, de forma similar a lo anterior, se confirmó que en el Paciente Canino 9 el valor del serodiagnóstico aumentó 3 meses más tarde debido a que el tumor no pudo escindirse de forma completa o a que se habría producido reaparición del tumor.

#### (2)-6 Diagnóstico de metástasis

El Paciente Canino 10 (Scottish Terrier), que experimentaba de forma repetida metástasis y reaparición, se diagnosticó en febrero de 2003 con tumor mamario; en agosto de 2003 con melanoma maligno intraoral; en enero de 2005 con melanoma maligno del labio y el 13 de abril de 2005 con melanoma intraoral, todos los cuales se

escindieron mediante cirugía. Este paciente acudió al hospital otra vez el 17 de diciembre de 2006 para el seguimiento tras la reaparición del melanoma intraoral en abril de 2005, y en ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm era de 0,42. El 20 de junio de 2007, medio año más tarde, el paciente acudió otra vez al hospital debido a la hipertrofia de los ganglios linfáticos cervicales y malares. En el caso de los linfomas la hipertrofia de los ganglios linfáticos se observa de forma sistemática. Debido a que el Paciente Canino 10 tenía sólo dos ganglios linfáticos inflamados, este paciente se diagnosticó de forma clínica con probable linfoma metastásico. El diagnóstico de acuerdo con la presente invención también reveló que era un tumor metastásico procedente de uno que había existido previamente en este paciente, dado que la absorbancia a 450 nm aumentó enormemente a 0,91.

(2)-7 Control de la terapia

El 27 de julio de 2007 el Paciente Canino 12 (raza mixta) se sometió a extirpación tumoral. El diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado reveló que el cáncer de mama creció de forma continua en los ductos mamarios. Por lo tanto, se diagnosticó a este paciente con carcinoma ductal. De acuerdo con el serodiagnóstico llevado a cabo en ese momento, la absorbancia a 450 nm era de 0,24. Hasta ese momento, es decir 13 meses después de la extirpación, no se había encontrado reaparición del cáncer. El serodiagnóstico se llevó a cabo otra vez el 3 de septiembre de 2007, aproximadamente 1 mes después de la extirpación; el 12 de octubre de 2007, dos meses después de la extirpación y el 1 de junio de 2008, 10 meses después de la extirpación. Como resultado, la absorbancia a 450 nm era de 0,18, 0,18 y 0,12, respectivamente.

Estos resultados obtenidos en el Paciente Canino 12 confirmaron que los valores se hacen más bajos que los detectados en un estado portador de cáncer si los tumores pueden eliminarse de forma completa, así como que el valor no aumenta a menos que reaparezca el cáncer y, por lo tanto, puede seguirse el cambio en los pacientes tratados. Además, también puede llevarse a cabo el diagnóstico de reaparición como se muestra en el Paciente Canino 8, lo que confirma que también puede hacerse posible el control de la terapia.

(2)-8 Diagnóstico de la malignidad del tumor recurrente

El 1 de mayo de 2005 el Paciente Canino 13 (Cobrador dorado) se sometió a extirpación tumoral. El diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado reveló que en este paciente el tumor era una lesión neoplásica maligna originada a partir del epitelio ductal mamario, es decir, carcinoma ductal mamario maligno y carcinoma papilar maligno que crecían de forma continua a través de los ductos mamarios. El 28 de junio de 2008, aproximadamente 3 años después de eso, se encontró otra vez el tumor y, por lo tanto, se llevó a cabo la extirpación. El diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado reveló que no se observaba bajo la piel alrededor de las suturas quirúrgicas nada excepto infiltración grave de células inflamatorias tales como neutrófilos, macrófagos, células plasmáticas y similares, lo que se consideró que era la cicatriz quirúrgica previa y, por lo tanto, se diagnosticó que el paciente no tenía lesiones neoplásicas. De acuerdo con el serodiagnóstico llevado a cabo en ese momento, la absorbancia a 450 nm era de 0, no se detectó en absoluto. Los resultados observados en los pacientes caninos 8, 9 y 13 indicaron que el valor del serodiagnóstico no aumenta o se mantiene en los casos en donde el tumor recurrente es maligno, y no se detecta en los casos en donde el tumor es benigno.

(2)-9 Pronóstico de un paciente canino portador de tumor benigno

El 9 de octubre de 2007 el Paciente Canino 14 (Caniche Toy) se sometió a extirpación tumoral. El diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado reveló que para formar el tumor proliferaron tanto células epiteliales mamarias como células mioepiteliales, pero que ninguna de ellas mostraba hallazgo de malignidad y, por lo tanto, este paciente se diagnosticó con tumor mixto benigno. De acuerdo con el serodiagnóstico llevado a cabo en ese momento, la absorbancia a 450 nm era de 0,05, casi no se detectó. Ocho meses tras eso, el 5 de junio de 2008, se recolectó otra vez una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0, no se detectó en absoluto. En ese momento no se encontró reaparición de forma clínica. Estos resultados indicaron que, incluso en el caso en donde el tumor es benigno, la extracción completa del tumor da como resultado el valor reducido del serodiagnóstico si se puede observar un valor detectable en el estado portador de cáncer y, por consiguiente, se puede lograr el pronóstico.

(3) Diagnóstico en gatos

A continuación se diagnosticaron gatos portadores de cáncer y gatos sanos. Utilizando el polipéptido parcial del CEP canino descrito anteriormente y el anticuerpo anti IgG de gato, se midió de la misma manera que se describe anteriormente el título de anticuerpos IgG de suero de felino que reacciona de forma específica con el polipéptido. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG de gato conjugado con HRP (FRACCIÓN IgG de CABRA para IgG de GATO CONJUGADO A PEROXIDASA (MOLECULA COMPLETA): fabricada por CAPPEL RESERCH REAGENTS) diluido 8.000 veces con la solución de bloqueo.

El 17 de agosto de 2005 el Paciente Felino 1 (Chinchilla) se sometió a la extirpación de un adenocarcinoma mamario. La absorbancia a 450 nm era de 0,48. En el Paciente Felino 2 (Himalayo), que había experimentado la

extirpación de un carcinoma ductal el 17 de octubre de 2006, la absorbancia a 450 nm era de 0,18. Por otro lado, no se detectó la absorbancia en absoluto en gatos sanos.

5 Por lo tanto, de forma similar a los perros, en muestras procedentes de gatos que padecían cáncer se detectó absorbancia, mientras que no se detectó en absoluto valor de absorbancia las muestras procedentes de gatos sanos. Por lo tanto, de forma similar a los perros, mediante este método que utiliza un polipéptido obtenido del CEP canino también pueden detectarse los cánceres en los gatos.

10 (4) Diagnóstico en seres humanos sanos

Utilizando el polipéptido parcial del CEP canino descrito anteriormente y el anticuerpo anti IgG de ser humano anterior, se midió de la misma manera que se describe anteriormente el título de anticuerpos IgG de suero de ser humano sano que reacciona de forma específica con el polipéptido. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti IgG de ser humano conjugado con HRP (cabra anti IgG (H+L) de ser humano conjugado con HRP: 15 fabricado por Zymed Laboratories) diluido 10.000 veces con la solución de bloqueo. Como control positivo se utilizó un antígeno de ovoalbúmina inmovilizado preparado inmovilizando sobre una fase sólida ovoalbúmina 50 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato. Como resultado, en el Ser Humano Sano 1 la absorbancia observada a 450 nm en un antígeno de ovoalbúmina era de 0,25, mientras que la absorbancia a 450 nm observada en la proteína recombinante era de 0,02, casi no detectada. De forma similar, en el Ser Humano Sano 2 la absorbancia observada a 450 nm en un antígeno de ovoalbúmina era de 0,18, mientras que la absorbancia observada a 450 nm en la proteína recombinante era de 0,03, casi no detectada.

Adicionalmente, se llevó a cabo el diagnóstico de la misma manera que se describe anteriormente, utilizando un CEP canino de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 26 preparada en el Ejemplo C-2. Como resultado, el diagnóstico se puede lograr de forma similar en seres humanos, perros y gatos.

Adicionalmente, utilizando el CEP canino de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 42 preparado en el Ejemplo C-2 se llevó a cabo el diagnóstico de la misma manera que se describe anteriormente. Como resultado, el diagnóstico se puede lograr de forma similar en seres humanos, perros y gatos.

30 Ejemplo C-4: diagnóstico del cáncer utilizando el polipéptido obtenido del CEP humano

Utilizando el polipéptido parcial del CEP humano (SEQ ID NO: 36; región de los aminoácidos 1513 a 2325 de la SEQ ID NO: 28) preparado en el Ejemplo C-2, se midió de la misma manera que en el Ejemplo C-3 el título de anticuerpos IgG de sueros de ser humano, canino y felino que reaccionan con el polipéptido.

El diagnóstico se llevó a cabo utilizando suero de ser humano sano. De la misma manera que en el Ejemplo C-3 (4), se utilizó como control positivo antígeno de ovoalbúmina. Como resultado, se detectó valor de absorbancia en el caso en donde la ovoalbúmina estaba inmovilizada en una fase sólida, mientras que el valor de absorbancia casi no se detectó en el caso en donde estaba inmovilizado en una fase sólida el polipéptido parcial del CEP humano.

De forma similar, en perros y gatos sanos la absorbancia a 450 nm casi no se detectó en el caso en donde el polipéptido estaba inmovilizado en una fase sólida.

45 Por otro lado, el 21 de junio de 2007 el Paciente Canino 11 (Shih Tzu) se sometió a la extirpación de un adenocarcinoma mamario. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, el tejido de la glándula mamaria contenía células invasivas elevadamente atípicas y creció para formar hiperplasia adenomatosa que mostraba estructuras masivas, grandes y pequeñas. Por consiguiente este paciente se diagnosticó con tumor maligno. En el Paciente Canino 11 la absorbancia a 450 nm era de 0,33. El diagnóstico de malignidad se llevó a 50 cabo utilizando 310 muestras de suero adicionales que se habían diagnosticado como malignas mediante diagnóstico patológico. Como resultado, mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que mostraba el doble del valor promedio de las muestras de caninos sanos, pudieron diagnosticarse de forma satisfactoria como malignas 185 muestras, es decir el 59,5 % de los casos malignos.

55 Además, en el Paciente Felino 3 (raza mixta) que se sometió a extirpación de un adenocarcinoma mamario el 3 de abril de 2007, la absorbancia a 450 nm era de 0,15.

Los resultados descritos anteriormente indicaron que utilizando un polipéptido obtenido del CEP humano también se puede llevar a cabo de forma similar el diagnóstico en seres humanos, perros y gatos.

60 Adicionalmente, se sometieron al diagnóstico muestras de efusión pleural y de ascitis recolectadas de perros con cáncer terminal, utilizando la proteína humana recombinante de la misma manera que la proteína canina recombinante. Como resultado, se pudieron detectar valores similares a los detectados en las muestras de suero y por consiguiente se pudo lograr de forma satisfactoria el diagnóstico del cáncer.

65 Además, se llevó a cabo el diagnóstico de la misma manera que se describió anteriormente, utilizando un CEP

humano de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 28 preparada en el Ejemplo C-2. Como resultado, también pudo llevarse a cabo el diagnóstico de forma similar en seres humanos, perros y gatos.

Ejemplo C-5: diagnóstico del cáncer midiendo el polipéptido antigénico (1)

5 Se inmunizaron ratones y conejos con la proteína canina recombinante que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 35 preparada en el Ejemplo C-2, para obtener un anticuerpo específico para este antígeno. Utilizando este anticuerpo policlonal, se llevó a cabo mediante ELISA de tipo sándwich la detección del polipéptido antigénico *per se* contenido en el suero procedente de un cuerpo vivo portador de cáncer. Utilizando el anticuerpo anti IgG de ratón se midió mediante ELISA de tipo sándwich la cantidad de la proteína en el suero que reacciona de forma específica con el anticuerpo policlonal preparado específico para la proteína.

15 Del mismo modo que para la inmovilización de un anticuerpo primario en una fase sólida, se añadieron 100 µl/pocillo del antisuero de conejo diluido 20 veces con solución salina tamponada con fosfato a una placa de 96 pocillos Immobilizer Amino (fabricada por Nunc), y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Del mismo modo que para el bloqueo, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de tampón bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,3) que contenía BSA al 0,5 % (seroalbúmina bovina, fabricada por Sigma Aldrich Japón) (denominada en lo sucesivo en este documento como solución de bloqueo), y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de suero procedente de cuerpo portador de cáncer diluido con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas para dejar que transcurra la reacción. Del mismo modo que para el suero diluido, se preparó una dilución en serie con factor 10 que variaba de 10 a 1.000 veces. Tras lavar 3 veces los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (fabricado por Wako Pure Chemicals) (denominado en lo sucesivo en este documento como PBS-T), se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de antisuero de ratón diluido 200 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de anticuerpo de IgG de ratón conjugado con HRP (cabra anti ratón conjugado con HRP estabilizado: fabricado por PIERCE) diluido 2.000 veces con la solución de bloqueo como anticuerpo terciario, y se agitó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de sustrato de HRP, TMB (TMB (tetrametilbencidina) 1-Step Turbo, fabricado por PIERCE), y se permitió que transcurra la reacción enzima-sustrato a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso se finalizó la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de solución de ácido sulfúrico 0,5 M (fabricada por Sigma Aldrich Japón), y después se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Como control, se midieron de la misma manera que se describe anteriormente una placa sobre la que no se inmovilizó antisuero de conejo y una placa con la que no reaccionó el suero procedente de un cuerpo portador de cáncer.

40 Como resultado, se detectó el polipéptido en perros y gatos portadores de cáncer que padecían liomiosarcoma cutáneo, cáncer de mama, melanoma maligno y similares, mientras que no se detectó el polipéptido en perros sanos, gatos sanos y seres humanos sanos. Por lo tanto, también pudieron diagnosticarse cánceres mediante este método en el que se detectó el polipéptido antigénico con un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno el polipéptido canino recombinante.

45 Además, se llevó a cabo el diagnóstico de la misma manera que se describe anteriormente, utilizando un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno el CEP canino de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 26 preparada en el Ejemplo C-2.

50 Como resultado, mediante este método en que el polipéptido antigénico se detectó con un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno un CEP canino de longitud completa, también pudieron diagnosticarse cánceres en perros y gatos.

Además, el diagnóstico se llevó a cabo de la misma manera que se describe anteriormente, utilizando un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno el CEP canino de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 42 preparada en el Ejemplo C-2.

55 Como resultado, también pudieron diagnosticarse cánceres en perros y gatos mediante este método, en que el polipéptido antigénico se detectó con un anticuerpo que se había preparado utilizando como inmunógeno un CEP canino de longitud completa.

Ejemplo C-6: diagnóstico del cáncer midiendo el polipéptido antigénico (2)

60 Se inmunizaron ratones y conejos con la proteína humana recombinante que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 36 preparada en el Ejemplo C-2 para obtener un anticuerpo específico para este antígeno. De la misma manera que en el Ejemplo C-5, mediante ELISA de tipo sándwich utilizando este anticuerpo policlonal, se llevó a cabo la detección del polipéptido antigénico *per se* contenido en el suero procedente de un cuerpo vivo portador de cáncer.

Como resultado, el polipéptido se detectó en perros y gatos portadores de cáncer que padecían liomiosarcoma cutáneo, cáncer de mama, melanoma maligno o similares, mientras que el polipéptido no se detectó en perros sanos, gatos sanos y seres humanos sanos. Por consiguiente, también pudieron diagnosticarse cánceres mediante este método en el que se detectó el polipéptido antigénico con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno el polipéptido humano recombinante.

Además, el diagnóstico se llevó a cabo de la misma manera que se describe anteriormente, utilizando un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno el CEP humano de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 28 preparada en el Ejemplo C-2.

Como resultado, también pudieron diagnosticarse cánceres en perros y gatos mediante este método en el que el polipéptido antigénico se detectó con un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno un CEP humano de longitud completa.

Ejemplo D-1: adquisición de una proteína antigénica de cáncer nueva mediante el método SEREX

(1) Preparación de la biblioteca de ADNc

Se preparó ARN total procedente de tejido testicular de un perro sano mediante el método del guanidina-fenol-cloroformo y se purificó el ARN poli(A) utilizando el kit de purificación de ARNm Oligotex-dT30 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) en conformidad con el protocolo adjunto al kit.

Utilizando el ARNm obtenido (5 µg) se sintetizó una fagoteca de ADNc de testículo de perro. La preparación de la fagoteca de ADNc se llevó a cabo utilizando el kit de síntesis de ADNc, el kit de síntesis de ZAP-ADNc y el kit de clonación de ZAP-ADNc Gigapack III Gold (fabricados por STRATAGENE), en conformidad con los protocolos adjuntos a los kits. El tamaño de la fagoteca de ADNc preparada era de  $1,3 \times 10^6$  ufp/ml.

(2) Exploración de la biblioteca de ADNc con suero

Se llevó a cabo la inmunoexploración utilizando la fagoteca de ADNc obtenida de testículo de perro preparada como se describe anteriormente. De forma más particular, se infectaron con la biblioteca células *E. coli* hospedadoras (XL1-Blue MRF'), de forma que debían aparecer 2.340 clones sobre una placa de agarosa NZY que tuvieran el tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm y se cultivaron a 42 °C durante 3 a 4 horas para dejar que los fagos formen placas. La placa se cubrió con una membrana de nitrocelulosa (Hybond C Extra: fabricada por GE Healthcare Bio-Science) impregnada con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) a 37 °C durante 4 horas para inducir y expresar proteínas, que se transfectaron así a la membrana. Posteriormente, la membrana se cubrió y empapó en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 %, seguido de la agitación a 4 °C durante una noche para suprimir reacciones no específicas. Se permitió que este filtro reaccionara con suero de paciente canino diluido 500 veces a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.

Al igual que el suero del paciente canino descrito anteriormente, se utilizó suero recolectado de pacientes caninos que padecían cáncer de mama. Este suero se almacenó a -80 °C y se pretrató inmediatamente antes de su uso. El método del pretratamiento del suero fue como sigue. A saber, se infectaron células *E. coli* hospedadoras (XL1-Blue MRF') con fago λ ZAP Express en el que no se había insertado un gen extraño, y después se cultivaron en medio de placa NZY a 37 °C durante una noche. Posteriormente, se añadió a la placa el tampón de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 8,3, que contenía NaCl 0,5 M, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante 15 horas, seguido de la recolección del sobrenadante como un extracto *E. coli*/fago. Después de eso se dejó que fluya el extracto de *E. coli*/fago recolectado a través de una columna NHS (fabricada por GE Healthcare BioScience) para inmovilizar en ella proteínas obtenidas de *E. coli*/fago. Se dejó que el suero procedente de los pacientes caninos fluyera a través y reaccionara con esta columna de proteína inmovilizada para eliminar anticuerpos adsorbidos en *E. coli* y/o el fago. La fracción de suero que pasó a través de la columna se diluyó 500 veces con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 %, y el diluyente resultante se utilizó como el material para la inmunoexploración.

La membrana sobre la que el suero así tratado y la proteína de fusión descrita anteriormente se transfirieron se lavó 4 veces con TBS-T (Tween 20 al 0,05 %/TBS) y se permitió que reaccionara con cabra anti IgG de perro (cabra anti IgG-h+I de perro conjugado con HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) como anticuerpo secundario diluido 5.000 veces con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 0,5 %, a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de la detección mediante reacción de coloración enzimática utilizando la solución de reacción NBT/BCIP (fabricada por Roche). Las colonias en las posiciones en donde se observó una reacción de coloración positiva se recuperaron a partir de la placa de agarosa NZY que tenía el tamaño de 90 mm de diámetro x 15 mm, y se disolvieron en 500 µl de tampón SM (NaCl 100 mM, MgClSO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl 50 mM, gelatina al 0,01 %; pH 7,5). La exploración se repitió como una segunda y tercera exploración de la misma manera que se describe anteriormente, hasta que se obtuvo una única colonia positiva para la reacción de coloración, aislando de este modo un clon positivo tras la exploración de 30.940 clones de fagos reactivos con las IgG en el suero.

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

Para someter al único clon positivo aislado mediante el método descrito anteriormente a un análisis de secuencia de bases, se llevó a cabo un procedimiento de conversión del vector de fago a un vector plasmídico. De forma más particular, se mezclaron 200 µl de una solución preparada para contener una *E. coli* hospedadora (XL1-Blue MRF<sup>+</sup>) de forma que la absorbancia a DO<sub>600</sub> debía ser de 1,0, con 100 µl de una solución de fago purificado y además con 1 µl de fago auxiliar ExAssist (fabricado por STRATAGENE), y se dejó que la reacción transcurriera a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron a la mezcla de reacción 3 ml de medio LB y se cultivó la mezcla a 37 °C durante 2,5 a 3 horas, seguido de la inmediata incubación en un baño de agua a 70 °C durante 20 minutos. Después, la mezcla se centrifugó a 4 °C a 1.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se recuperó como una solución de fagémido. Posteriormente, se mezclaron 200 µl de una solución preparada para contener una *E. coli* hospedadora de fagémido (SOLR) de forma que la absorbancia a DO<sub>600</sub> debía ser de 1,0 cuando se mezclara con 10 µl de una solución de fago purificado, y se dejó que la reacción transcurriera a 37 °C durante 15 minutos. Después de eso, se sembraron en placas 50 µl de la mezcla de reacción en medio LB agar que contenía ampicilina (concentración final: 50 µg/ml) y se cultivó a 37 °C durante una noche. Se recuperó una única colonia de SOLR transformada y se cultivó en medio LB que contenía ampicilina (concentración final: 50 µg/ml) a 37 °C, seguido de la purificación del ADN plasmídico que tenía el inserto de interés, utilizando el Kit QIAGEN plasmid Miniprep (fabricado por Qiagen).

El plásmido purificado se sometió a un análisis de la secuencia entera del inserto mediante el método del cebador en avance utilizando el cebador T3 descrito en la SEQ ID NO: 5 y el cebador T7 descrito en la SEQ ID NO: 6. Mediante este análisis de secuencia se obtuvo la secuencia génica descrita en la SEQ ID NO: 44. Utilizando la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de este gen, se llevó a cabo la búsqueda de homología frente a genes conocidos utilizando el programa de búsqueda de homología BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Como resultado, se reveló que el gen obtenido es el gen *TRIP11*. El factor homólogo humano de *TRIP11* era el *TRIP11* humano (homología: secuencia de bases, el 88 %; secuencia de aminoácidos, el 86 %). La secuencia de bases del *TRIP11* humano se muestra en la SEQ ID NO: 46 y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en la SEQ ID NO: 47.

## (4) Análisis de la expresión en cada tejido

Se investigó mediante el método de RT-PCR (transcripción inversa-PCR) la expresión en tejidos normales y en diversas líneas celulares de perro y de ser humano del gen que se obtuvo mediante el método descrito anteriormente. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo como sigue. A saber, se extrajo ARN total procedente de 50 a 100 mg de cada tejido o de 5 a 10 x 10<sup>6</sup> células de cada línea celular utilizando reactivo TRIZOL (fabricado por Invitrogen) en conformidad con el protocolo adjunto al kit. Utilizando este ARN total, se sintetizó ADNc mediante el sistema de síntesis de la primera cadena Superscript para RT-PCR (fabricado por Invitrogen), en conformidad con el protocolo adjunto al kit. Del mismo modo que para los ADNc procedentes de tejidos normales humanos (cerebro, hipocampo, testículo, colon y placenta) se utilizó ADNc Gene Pool (fabricado por Invitrogen), ADNc QUICK-Clon (fabricado por CLONTECH) y una biblioteca de ADNc de inserto grande (fabricada por CLONTECH). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo como sigue, utilizando cebadores (descritos en las SEQ ID NO: 48 y 49) específicos para el gen obtenido. A saber, se mezclaron los respectivos reactivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 0,25 µl de la muestra preparada mediante la reacción de transcripción inversa, cada uno de los cebadores anteriores 2 µM, cada uno de los dNTP 0,2 mM y polimerasa ExTaq 0,65 U (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) en un volumen total de 25 µl, y la reacción se llevó a cabo con 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1,5 minutos, utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Los cebadores específicos de gen descritos anteriormente fueron los que amplifican las regiones de las bases 1519 a 2957 de la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 44 (gen *TRIP11* canino) y las bases 1872 a 3310 de la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 46 (gen *TRIP11* humano), y pueden utilizarse para investigar la expresión tanto del gen *TRIP11* canino como del gen *TRIP11* humano. Como control para la comparación se utilizaron de forma simultánea cebadores (descritos en las SEQ ID NO: 9 y 10) específicos para *GAPDH*. Como resultado, como se muestra en la Fig. 13, se observó en testículo una fuerte expresión del gen *TRIP11* canino entre los tejidos de perro normales y, por otro lado, se observó una fuerte expresión en la línea celular de cáncer de mama canina. La expresión del gen *TRIP11* humano se confirmó solo en testículo entre los tejidos normales de ser humano, al igual que en el caso del gen *TRIP11* canino, no obstante, se detectó la expresión en muchos tipos de líneas celulares de cáncer tales como tumor cerebral, leucemia, cáncer de mama, cáncer de pulmón y líneas de células de cáncer de esófago, entre las líneas celulares de cáncer humano. Por lo tanto, también se confirmó que el gen *TRIP11* humano se expresa de forma específica en células de testículo y cancerosas.

En la Fig. 13, el número de referencia 1 en las ordenadas indica el patrón de expresión del gen *TRIP11* y el número de referencia 2 indica el patrón de expresión del gen *GAPDH* como control para la comparación.

Ejemplo D-2: preparación de las proteínas *TRIP11* canina y humana

## (1) Preparación de la proteína recombinante

65

Mediante el siguiente método se preparó una proteína recombinante a base del gen de la SEQ ID NO: 44 obtenido en el Ejemplo D-1. Se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 1 µl del vector que se preparó a partir de la solución de fagémido obtenida en el Ejemplo D-1 y que se sometió al análisis de secuencia, cada uno de los dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción *Sall* y *XhoI* (descritos en las SEQ ID NO: 50 y 51) 0,4 µM, los dNTP 0,2 mM y polimerasa PrimeSTAR HS (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) 1,25 U en un volumen total de 50 µl, y se llevó a cabo la PCR con 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 6 minutos, utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Utilizando los dos tipos de cebadores descritos anteriormente se obtuvo una región que codifica una región de aminoácidos (SEQ ID NO: 54) de los aminoácidos 237 a 1023 de la SEQ ID NO: 45. Tras la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,4 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

De la misma manera, se llevó a cabo la PCR utilizando dos tipos de cebadores descritos en las SEQ ID NO: 56 y 57 para obtener una región que codifica la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 45. Tras la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 6,0 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

Cada uno de los fragmentos de ADN purificado se ligó en un vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante, y tras eso se recuperaron los plásmidos, seguido de la confirmación mediante secuenciación de que el fragmento génico amplificado coincide con la secuencia de interés. El plásmido que coincidía con la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *Sall* y *XhoI* y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick, seguido de la inserción de la secuencia génica de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET30b (fabricado por Novagen) que se había tratado con *Sall* y *XhoI*. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante de fusión etiquetada con His. Se transformó con este plásmido *E. coli* para la expresión, BL21 (DE3) y se indujo en *E. coli* la expresión de la proteína de interés con IPTG 1 mM.

Adicionalmente, a base del gen de la SEQ ID NO: 46 se preparó mediante el siguiente método una proteína recombinante del gen homólogo humano. Se mezclaron los reactivos respectivos y el tampón adjunto de forma que la mezcla debía contener 1 µl del ADNc preparado en el Ejemplo D-1, cuya expresión en diversos tejidos/células pudo confirmarse mediante el método de RT-PCR, cada uno de los dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción de *NdeI* y *KpnI* (descritos en las SEQ ID NO: 52 y 53) 0,4 µM, los dNTP 0,2 mM y la polimerasa PrimeSTAR HS (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) 1,25 U, en un volumen total de 50 µl, y se llevó a cabo la PCR con 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 6 minutos utilizando un ciclador térmico (fabricado por BIO RAD). Utilizando los dos tipos de cebadores descritos anteriormente, se obtuvo una región que codifica una región de aminoácidos (SEQ ID NO: 55) de los aminoácidos 236 a 1023 de la SEQ ID NO: 47. Tras la PCR se sometió al ADN amplificado a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,4 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

De la misma manera, se llevó a cabo la PCR utilizando dos tipos de cebadores, descritos en las SEC ID NO: 58 y 59, para obtener una región que codifica la secuencia de aminoácidos entera de la SEQ ID NO: 47. Tras la PCR, se sometió al ADN amplificado a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 % y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 6,0 kpb utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).

Cada uno de los fragmentos de ADN purificado se ligó en un vector de clonación pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen). Se transformó *E. coli* con el producto de ligamiento resultante y tras eso se recuperaron los plásmidos, seguido de la confirmación mediante secuenciación de que el fragmento génico amplificado coincide con la secuencia de interés. El plásmido que coincidió con la secuencia de interés se trató con las enzimas de restricción *NdeI* y *KpnI* y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick, seguido de la inserción de la secuencia génica de interés en un vector de expresión para *E. coli*, pET30b (fabricado por Novagen), que se había tratado con *NdeI* y *KpnI*. El uso de este vector permite la producción de una proteína recombinante de fusión etiquetada con His. Se transformó con este plásmido *E. coli* para la expresión, BL21 (DE3), y con IPTG 1 mM se indujo en *E. coli* la expresión de la proteína de interés.

## (2) Purificación de las proteínas recombinantes

Las células *E. coli* recombinantes obtenidas anteriormente que expresaban una parte de la SEQ ID NO: 44 y una parte de la SEQ ID NO: 46, respectivamente, se cultivaron en medio LB que contenía kanamicina (concentración final: 30 µg/ml) a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó aproximadamente 0,7 y después se añadió IPTG al mismo de forma que su concentración final debía ser 1 mM, seguido de su cultivo a 30 °C durante 20 horas. Posteriormente, se recolectaron las células mediante centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos. Se suspendió el sedimento de las células en solución salina tamponada con fosfato y para lavar las células se sometió adicionalmente a centrifugación a 4.800 rpm durante 10 minutos.

Las células se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato y se trataron con ultrasonido en hielo. La solución de *E. coli* tratada con ultrasonido se centrifugó a 7.000 rpm durante 15 minutos para obtener el sobrenadante como la fracción soluble y el precipitado como la fracción insoluble.

5 La fracción insoluble se suspendió en solución de Tritón X-100 al 4 % y la suspensión resultante se centrifugó a 7.000 rpm durante 10 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces y se llevó a cabo un procedimiento de eliminación de proteasas. Después de eso se suspendió el residuo en solución salina tamponada con fosfato y se llevó a cabo un procedimiento de eliminación del tensioactivo.

10 El residuo se suspendió en tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía hidrocloreto de guanidinio (fabricado por Sigma Aldrich Japón) 6 M y la suspensión resultante se dejó reposar a 4 °C durante 15 horas para desnaturar las proteínas. Después de eso, se centrifugó la suspensión a 7.000 rpm durante 20 minutos y la fracción soluble obtenida se colocó en una columna quelante de níquel preparada mediante un método convencional (transportador: Chelating Sepharose (marca registrada) Fast Flow (GE Health Care); volumen de columna: 5 ml, tampón de equilibrio: tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía hidrocarburo de guanidinio 6 M). La fracción que no se adsorbió a la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía cloruro de sodio 6 M y tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía imidazol 10 mM, y la elución se llevó a cabo inmediatamente un gradiente de densidad de cuatro etapas de imidazol 50 mM-500 mM. Se recolectaron cinco volúmenes de columna de las fracciones eluidas en cada etapa de elución. La elución de las proteínas de interés se confirmó mediante tinción de Coomassie llevada a cabo de acuerdo con un método convencional. A base del resultado se desalaron y concentraron las fracciones eluidas para obtener el material para la fase sólida para el diagnóstico.

25 De la misma manera, se cultivaron las células *E. coli* recombinantes que expresaban respectivamente las SEQ ID NO: 45 y 47 de longitud completa y se purificaron las proteínas de interés para obtener el material para la fase sólida para el diagnóstico.

Ejemplo D-3: diagnóstico del cáncer utilizando el polipéptido obtenido de la TRIP11 canina

30 (1) Diagnóstico del cáncer en perros

Se recolectaron muestras de sangre procedentes de 486 pacientes caninos en los que se encontraron tumores malignos y benignos y de 6 perros sanos, y se separaron sueros a partir de ellas. Utilizando el polipéptido parcial de la TRIP11 canina (SEQ ID NO: 54; región de los aminoácidos 237 a 1023 de la SEQ ID NO: 45) preparado en el Ejemplo D-2 y el anticuerpo anti IgG de perro, se midió mediante ELISA el título de anticuerpos IgG de los sueros que reaccionan de forma específica con el polipéptido.

40 Del mismo modo que para la inmovilización de la proteína preparada en una fase sólida, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución de la proteína recombinante diluida hasta 50 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato a una placa de 96 pocillos Immobilizer Amino (fabricada por Nunc), y se dejó reposar la placa a 4 °C durante una noche. Del mismo modo que para el bloqueo, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de tampón bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,3) que contenía BSA al 0,5 % (seroalbúmina bovina, fabricada por Sigma Aldrich Japón) (denominado en lo sucesivo en este documento como solución de bloqueo), y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó 1.000 veces la muestra de suero con la solución de bloqueo y se añadieron a la placa 100 µl/pocillo del suero diluido, seguido de la agitación de la placa a temperatura ambiente durante 3 horas para dejar que transcurra la reacción. Después de lavar 3 veces los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (fabricado por Wako Pure Chemicals) (denominado en lo sucesivo en este documento como PBS-T), se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de anticuerpo de IgG de perro conjugado con HRP (cabra anti IgG-h+I de perro conjugado con HRP: fabricado por BETHYL Laboratories) diluido 3.000 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de un sustrato de HRP, TMB (tetrametilbencidina) 1-Step Turbo, fabricado por PIERCE), y se dejó que transcurra la reacción enzima-sustrato a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso se finalizó la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de solución de ácido sulfúrico 0,5 M (fabricada por Sigma Aldrich Japón) y después se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Como control, se midieron de la misma manera que anteriormente una placa sobre la que no se inmovilizó la proteína recombinante preparada y una placa con la que no reaccionó el suero procedente de un perro portador de cáncer.

60 Entre el total de 486 muestras utilizadas en el diagnóstico del cáncer descrito anteriormente, se diagnosticaron de forma definitiva como malignas 311 muestras mediante el diagnóstico patológico utilizando el tejido tumoral extirpado.

65 De forma específica, las muestras se diagnosticaron como cáncer, tal como melanoma maligno; tumor mixto maligno; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células basales; epulis acantomatoso; tumor intraoral; adenocarcinoma perianal; tumor de la glándula anal; carcinoma apocrino de la glándula anal; tumor de células de Sertoli; cáncer de vulva; adenocarcinoma sebáceo; epitelioma sebáceo; adenoma sebáceo; carcinoma de glándulas

sudoríparas; adenocarcinoma intranasal; adenocarcinoma nasal; cáncer de tiroides; cáncer de colon; adenocarcinoma bronquial; adenocarcinoma; carcinoma ductal; adenocarcinoma mamario; adenocarcinoma mamario combinado; tumor mixto maligno de la glándula mamaria; adenocarcinoma papilar intraductal; fibrosarcoma; hemangiopericitoma; osteosarcoma; condrosarcoma; carcinoma de tejidos blandos; sarcoma histiocítico; mixosarcoma; sarcoma indiferenciado; cáncer de pulmón; mastocitoma; liomioma cutáneo; liomioma intra abdominal; liomioma; carcinoma de células escamosas; leucemia linfocítica crónica; linfoma; linfoma gastrointestinal; linfoma de órganos digestivos; linfoma de células pequeñas o de células medianas; tumor adrenomedular; tumor de células de la granulosa; feocromocitoma; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales); inflamación supurante; tumor de hígado intra abdominal; cáncer de hígado; plasmocitoma; hemangiopericitoma maligno; angiosarcoma; adenocarcinoma de la glándula anal; cáncer oral; melanoma maligno metastásico; melanoma maligno amelanítico; melanoma maligno cutáneo; mioepitelioma maligno; seminoma maligno; seminoma; adenocarcinoma del intestino grueso; adenocarcinoma gástrico; carcinoma sebáceo de escasa malignidad; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma apocrino; carcinoma de glándulas sudoríparas apocrino poco diferenciado; histiocitoma fibroso maligno; mieloma múltiple; tumor maligno mesenquimatoso; liposarcoma; osteosarcoma; sarcoma de origen desconocido; sarcoma de partes blandas (tumor de células fusiformes); sarcoma poco diferenciado; sarcoma sinovial; angiosarcoma; epitelioma maligno metastásico; adenocarcinoma mamario tubular; carcinoma ductal mamario; cáncer de mama inflamatorio; germinoma; leucemia; tricoepitelioma invasivo; linfoma de células medianas; linfoma multicéntrico; osteosarcoma (glándula mamaria); mastocitoma (de tipo II según Patnaik); mastocitoma (de grado II); liomiosarcoma o similar.

Como se muestra en la Fig. 15, los sueros procedentes de estos perros portadores de cáncer mostraron un título de anticuerpo significativamente elevado frente a la proteína recombinante. Se reveló que mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que mostraba el doble del valor promedio de las muestras de caninos sanos, pudieron diagnosticarse de forma satisfactoria como malignas 78 muestras, es decir el 25,1 % de los casos malignos. Los detalles de estas 78 muestras de cáncer son como sigue. Cabe señalar que el siguiente número de cada caso de cáncer es un total acumulativo, dado que algunas muestras contenían múltiples primarios.

Melanoma maligno, 4 casos; linfoma, 5 casos; inflamación supurante, 1 caso; tumor de células de la granulosa, 1 caso; carcinoma hepatocelular, 2 casos; tumor testicular maligno, 2 casos; tumor intraoral, 3 casos; adenoma perianal, 5 casos; osteosarcoma, 2 casos; carcinoma ductal, 6 casos; adenocarcinoma mamario, 16 casos; adenocarcinoma mamario combinado, 8 casos; cáncer de pulmón, 1 caso; adenocarcinoma sebáceo, 2 casos; mastocitoma, 6 casos; liomiosarcoma, 2 casos; carcinoma de células escamosas, 4 casos; tumor mixto maligno, 1 caso; melanoma maligno metastásico, 1 caso; carcinoma ductal mamario, 1 caso; carcinoma apocrino, 1 caso; adenocarcinoma gástrico, 1 caso; linfoma multicéntrico, 1 caso; seminoma, 1 caso; plasmocitoma, 1 caso.

El método de diagnóstico descrito anteriormente también se llevó a cabo utilizando muestras de efusión pleural y muestras de ascitis recolectadas de perros con cáncer terminal. Como resultado, se pudieron detectar valores similares a los detectados en las muestras de suero, y por consiguiente se pudo lograr de forma satisfactoria el diagnóstico del cáncer.

Adicionalmente, se confirmó que las estrategias de diagnóstico tales como el diagnóstico de cánceres que existen en una parte invisible del cuerpo, la evaluación de la fase y el grado del cáncer, el seguimiento de los pacientes posquirúrgicos, el diagnóstico de reaparición y metástasis y similares, también se puede lograr aplicando el método diagnóstico descrito anteriormente. Los siguientes son varios de los ejemplos prácticos del diagnóstico detallado mostrado en la Fig. 4.

#### (2)-1 Diagnóstico de tumores invisibles

El 7 de junio de 2007 no se encontró ningún tumor en el Paciente Canino 1 (Cobrador de pelo liso). Pero aproximadamente 20 días más tarde, el 24 de junio de 2007, se encontró un tumor pedunculado con un diámetro de 2 mm en la encía en la base del colmillo. El día que se lo encontró se ligó el tumor en su parte pedunculada y se lo escindió. La absorbancia a 450 nm observada después de que el tumor se hiciera visible a simple vista era de 0,15, lo que era significativamente elevada y no muy distinta de la absorbancia en el momento del hallazgo del tumor, 0,14. El resultado indica que mediante el método de la presente invención es posible diagnosticar cánceres incluso en una parte invisible tal como una parte intraperitoneal.

La elevación del valor se observó antes de que el tumor se haga visible a simple vista, lo que se considera que fue un signo del desarrollo tumoral. Por lo tanto, el método de la presente invención es útil en los exámenes médicos tales como la revisión de salud periódica.

Dos semanas tras la escisión tumoral el Paciente Canino 1 se exploró otra vez mediante el serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm fue 0, no se detectó. Por lo tanto, también se confirmó que el tumor que expresaba el antígeno de cáncer que había provocado el título anticuerpos aumentado se eliminó de forma completa (véase (2)-4, Seguimiento de pacientes posquirúrgicos).

(2)-2 Evaluación de la fase de evolución del cáncer

La fase de evolución del cáncer se determina a base del tamaño o la profundidad del tumor, de cuanta influencia ejerce el tumor sobre los tejidos circundantes, de si el tumor produce metástasis o no, y similares. Se reveló en el presente documento que el valor detectado es más elevado que antes de que se produzca la metástasis, es decir, el cáncer ha avanzado.

(2)-3 Evaluación del grado de malignidad del cáncer

Los basaliomas incluyen el tipo maligno y el tipo benigno. Desde hace un tiempo, de acuerdo con la nueva clasificación de la OMS, los basaliomas malignos se llaman carcinomas de células basales y los basaliomas benignos se llaman tricoblastomas.

El Paciente Canino 2 (Beagle) se diagnosticó con carcinoma de células basales (maligno). El serodiagnóstico se llevó a cabo en el momento de la cirugía. Como resultado, la absorbancia a 450 nm fue 0,15. Por otro lado, en el Paciente Canino 3 (raza mixta), diagnosticado con tricoblastoma (benigno), el serodiagnóstico llevado a cabo en el momento de la cirugía reveló que la absorbancia a 450 nm fue 0, no se detectó en absoluto. Por lo tanto, incluso en el caso de los mismos basaliomas, se pueden diagnosticar de forma distintiva el carcinoma de células basales maligno y el tricoblastoma benigno.

El próximo ejemplo es en tumores de glándula mamaria. Los tumores de glándula mamaria incluyen tumores malignos tales como adenocarcinoma mamario y tumor mixto maligno de glándula mamaria, y tumores mamarios benignos que no muestran síntomas de malignidad. El 17 de mayo de 2006 el Paciente Canino 4 (Yorkie) se sometió a la extirpación de un tumor mixto maligno de glándula mamaria y un de carcinoma mamario. En general, la escisión completa de los tumores mixtos en la glándula mamaria es fácil debido a que son poco invasivos de los tejidos circundantes, incluso si son malignos y, por lo tanto, habitualmente el transcurso posquirúrgico de los pacientes no tiene incidencias. Sin embargo, el Paciente Canino 4 se había diagnosticado con tumor elevadamente maligno, debido a que el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado reveló que algunos componentes de la muestra de ensayo procedente del Paciente Canino 4 mostraban una naturaleza invasiva. Por otro lado, el adenocarcinoma mamario es un tumor elevadamente invasivo que a menudo reaparece y produce metástasis. Aunque no se observó invasión de las células tumorales de la muestra de ensayo procedente del Paciente Canino 4, se había señalado que los componentes elevadamente malignos posiblemente proliferaron en otra región fuera de la muestra de ensayo. Por lo tanto, los hallazgos en el diagnóstico patológico mostraron claramente que el Paciente Canino 4 padecía cáncer mamario elevadamente maligno. Durante la cirugía se recolectó una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era 0,20. El 28 de enero de 2007 el Paciente Canino 5 (Yorkshire Terrier) se sometió a la extirpación de un tumor mamario. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, la atipia de las células era baja y, por lo tanto, el Paciente Canino 5 se diagnosticó con adenoma mamario benigno sin hallazgos de malignidad. Durante la cirugía se recolectó una muestra de sangre y se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era 0. Los resultados en los dos casos anteriores revelaron que los tumores elevadamente malignos muestran un valor más elevado que los tumores benignos, poco malignos.

(2)-4 Seguimiento de los pacientes posquirúrgicos

El Paciente Canino 6 (Shih Tzu) acudió al hospital debido a un tumor intraoral y se sometió a la extirpación el 22 de marzo de 2007. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm era 0,12. Además, a base del diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, se diagnosticó al Paciente Canino 6 con epulis acantomatoso maligno. Este tipo de tumor con frecuencia reaparece si la escisión es insuficiente, a pesar de que la metástasis a distancia raramente se produce. Por lo tanto, es importante si el tumor se puede escindir de forma completa o no mediante cirugía. De acuerdo con el seguimiento el 18 de mayo de 2007, la absorbancia a 450 nm fue de 0,02 y por consiguiente el título de anticuerpos disminuyó. No se encontró reaparición hasta agosto de 2007. Por lo tanto, se considera que el valor detectado mediante el serodiagnóstico se hizo más bajo que el obtenido en el momento de la cirugía debido a que en el Paciente canino 6 el tumor pudo escindirse de forma completa.

El Paciente Canino 7 (Yorkie) se diagnosticó mediante serodiagnóstico utilizando una muestra de suero recolectada el 17 de mayo de 2006, y la absorbancia a 450 nm era de 0,20. Este paciente acudió al hospital el 16 de diciembre de 2006 para el seguimiento, y se llevó a cabo a través del diagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm era de 0. No se encontró ni reaparición ni metástasis hasta agosto de 2007. Por lo tanto, se considera que el valor detectado mediante serodiagnóstico se hizo más bajo que el obtenido en el momento de la cirugía debido a que en el Paciente Canino 7 el tumor pudo escindirse de forma completa.

(2)-5 Diagnóstico de reaparición

El 8 de mayo de 2007 el Paciente Canino 8 (Husky) se sometió a la extirpación de un adenocarcinoma mamario. En el momento de la cirugía se llevó a cabo el serodiagnóstico y la absorbancia a 450 nm era de 0,04. El diagnóstico

patológico utilizando el tejido extirpado reveló que proliferaron células epiteliales elevadamente atípicas y que principalmente formaron estructuras ductales y, por lo tanto, este paciente se diagnosticó con adenocarcinoma de mama primario. Se dijo que el paciente estaba en riesgo elevado de reaparición o metástasis en los ganglios linfáticos u órganos a distancia, dado que en ese momento ya habían entrado en los vasos linfáticos muchas células cancerosas. El 28 de junio de 2007, aproximadamente 1 mes y medio tras la cirugía, se encontró metástasis en el mismo sitio. Se llevó a cabo el serodiagnóstico en ese momento para hallar que el valor aumentó a 0,07. Por lo tanto, se confirmó que el valor detectado mediante el serodiagnóstico era más elevado hacia finales de junio que a principios de mayo debido a que el tumor no se había escindido de forma completa o a que se había producido reaparición en el Paciente Canino 8.

#### (2)-6 Diagnóstico de metástasis

El Paciente Canino 9 (Scottish Terrier), que experimentaba de forma repetida metástasis y reaparición, se diagnosticó con tumor mamario en febrero de 2003; con melanoma maligno intraoral en agosto de 2003; con melanoma maligno en el labio en enero de 2005 y con melanoma intraoral el 13 de abril de 2005, todos los cuales se escindieron mediante cirugía. Este paciente acudió al hospital otra vez el 17 de diciembre de 2006 para el seguimiento tras la reaparición del melanoma intraoral en abril de 2005, y en ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico para encontrar que la absorbancia a 450 nm era de 0. Medio año más tarde, el 20 de junio de 2007, el paciente acudió otra vez al hospital debido a la hipertrofia de los ganglios linfáticos cervicales y malares. En el caso de los linfomas, la hipertrofia de los ganglios linfáticos se observa de forma sistemática. Debido a que el Paciente Canino 9 tenía sólo dos ganglios linfáticos inflamados, este paciente se diagnosticó de forma clínica como probable linfoma metastásico. El diagnóstico de acuerdo con la presente invención también reveló que era un tumor que había metastatizado a partir del tumor que existía previamente en este paciente, dado que la absorbancia a 450 nm aumentó enormemente hasta 0,27.

El 11 de marzo de 2006 el Paciente Canino 10 (Shiba Inu) se sometió a la extirpación de un melanoma maligno oral en el labio derecho. Este paciente tiene una historia de tratamiento con fármaco antineoplásico (ciclofosfamida) desde el 10 de junio hasta el 26 de septiembre de 2006, y desde el 23 de mayo de 2006 había recibido BIREMO S, que contiene germanio orgánico como componente principal. El 20 de marzo de 2007 este paciente se sometió a la extirpación de un tumor que se consideró que era metástasis procedente del tumor mencionado anteriormente y se llevó a cabo el serodiagnóstico. Como resultado, la absorbancia a 450 nm era aproximadamente de 0, casi no se detectó. A base del diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado en ese momento, el Paciente Canino 10 se diagnosticó con melanoma maligno metastásico. El 27 de junio de 2007, tres meses después de la extirpación del melanoma metastásico, otra vez se produjo metástasis en este paciente. El tumor que se extirpó el 20 de marzo de 2007 existía en la parte cervical derecha y el tumor que apareció el 27 de junio de 2007 estaba en el lado contrario. Al igual que la forma del tumor, se formó una masa negra de forma similar al tumor previo. El tumor, que tenía el tamaño de 3,1 x 3,2 x 0,8 cm, también se diagnosticó de forma clínica como metástasis. Se llevó a cabo otra vez el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm aumentó a 0,02, lo que indicó que era un tumor metastásico procedente del anterior.

#### (2)-7 Control de la terapia

El 19 de abril de 2007 el Paciente Canino 12 (Dachshund miniatura) se sometió a extirpación tumoral. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado, el paciente padecía adenocarcinoma mamario combinado moderadamente maligno con una elevada probabilidad de desarrollo invasivo y metastásico. En ese momento se llevó a cabo el serodiagnóstico y la absorbancia a 450 nm era de 0,03. El 3 de junio de 2008, aproximadamente un año tras la extirpación, se llevó a cabo el serodiagnóstico para hallar que la absorbancia a 450 nm era de 0, no se detectó en absoluto. Aunque no se encontró a simple vista ningún tumor recurrente, para prevenir la reaparición se administró un fármaco antineoplásico (INTERCAT) una vez por semana durante 2 meses. Tras el inicio de la administración del fármaco anticanceroso se llevó a cabo el serodiagnóstico a las 2, 4 y 6 semanas. Como resultado, la absorbancia a 450 nm fue de 0 en todos los experimentos, no se detectó en absoluto. Estos resultados obtenidos en el Paciente Canino 12 confirmaron que el valor se hace más bajo que el detectado en un estado portador de cáncer si los tumores pueden eliminarse de forma completa, así como que el valor no aumenta si el tratamiento con fármaco antineoplásico previene de forma satisfactoria la metástasis del cáncer y, así, se puede seguir el cambio en los pacientes tratados. Además, el diagnóstico de reaparición también puede llevarse a cabo como se muestra en el Paciente Canino 8, lo que confirma que también puede hacerse posible el control de la terapia.

#### (2)-8 Diagnóstico de malignidad del tumor recurrente

El 1 de mayo de 2005 el Paciente Canino 13 (Cobrador dorado) se sometió a extirpación tumoral. El diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado reveló que el tumor en este paciente era una lesión neoplásica maligna originada del epitelio ductal mamario, es decir, carcinoma ductal mamario maligno y carcinoma papilar maligno que crecían de forma continua a través de los ductos mamaros. Aproximadamente 3 años después de eso, el 28 de junio de 2008, se encontró tumor otra vez y por lo tanto se llevó a cabo la extirpación. El diagnóstico patológico utilizando el tumor extirpado reveló que alrededor de las estructuras quirúrgicas debajo de la piel no podía observarse nada excepto la infiltración grave de células inflamatorias tales como neutrófilos, macrófagos, células

5 plasmáticas y similares, lo que se consideró que era la cicatriz quirúrgica previa, y así el paciente se diagnosticó como que no tenía lesiones neoplásicas. De acuerdo con el serodiagnóstico llevado a cabo en ese momento, la absorbancia a 450 nm era de 0, no se detectó en absoluto. Los resultados observados en los Pacientes Caninos 8 y 13 indicaron que el valor del serodiagnóstico no disminuye o se mantiene en los casos en donde el tumor recurrente es maligno, y no se detecta en los casos en donde el tumor es benigno.

### (3) Diagnóstico en gatos

10 A continuación, se diagnosticaron gatos portadores de cáncer y gatos sanos. Utilizando el polipéptido parcial de la TRIP11 canina descrito anteriormente y el anticuerpo anti IgG de gato, se midió de la misma manera que se describe anteriormente el título de anticuerpos IgG de un suero felino que reaccionan de forma específica con el polipéptido. Se utilizó como anticuerpo secundario un anticuerpo anti IgG de gato conjugado a HRP (FRACCIÓN IgG de CABRA para IgG de GATO CONJUGADO A PEROXIDASA (MOLECULA COMPLETA): fabricado por CAPPEL RESERCH REAGENTS) diluido 8.000 veces con la solución de bloqueo.

15 El 17 de agosto de 2005 el Paciente Felino 1 (Chinchilla) se sometió a la extirpación tumoral de un adenocarcinoma mamario. La absorbancia a 450 nm era de 0,05. En el Paciente Felino 2 (Himalayo), que se sometió a extirpación de un carcinoma ductal el 17 de octubre de 2006, la absorbancia a 450 nm era de 0,34. Por otro lado, en gatos sanos no se detectó absorbancia en absoluto.

20 Por lo tanto, de forma similar a los perros, se detectó valor de absorbancia en muestras procedentes de gatos que padecían cáncer, aunque no se detectó en absoluto valor de absorbancia en muestras procedentes de gatos sanos. Por consiguiente, de forma similar a los perros, también se pueden detectar cánceres en gatos mediante este método.

### 25 (4) Diagnóstico en seres humanos sanos

Utilizando el polipéptido parcial de la TRIP11 canina descrito anteriormente y el anticuerpo anti IgG de ser humano anterior, se midió de la misma manera que se describe anteriormente el título de anticuerpos IgG de suero de ser humano sano que reaccionan de forma específica con el polipéptido. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG humanas conjugado con HRP (cabra anti IgG (H+L) humanas conjugado con HRP: fabricado por Zymed Laboratories) diluido 10000 veces con la solución de bloqueo. Como control positivo se utilizó un antígeno de ovoalbúmina inmovilizado preparado inmovilizando en una fase sólida ovoalbúmina 50 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato. Como resultado, en el Ser Humano Sano 1, la absorbancia a 450 nm observada en un antígeno de ovoalbúmina era de 0,25, aunque la absorbancia a 450 nm observada en la proteína recombinante era de 0, no se detectó en absoluto. De forma similar, en el Ser Humano Sano 2, la absorbancia a 450 nm observada en un antígeno de ovoalbúmina era de 0,18, aunque la absorbancia a 450 nm observada en la proteína recombinante era de 0, no se detectó en absoluto.

40 Adicionalmente, se llevó a cabo el diagnóstico de la misma manera que se describe anteriormente, utilizando una TRIP11 canina de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 45, preparada en el Ejemplo D-2. Como resultado, se reveló que el diagnóstico se puede lograr de forma similar en seres humanos, perros y gatos.

### 45 Ejemplo D-4: Diagnóstico del cáncer utilizando el polipéptido obtenido de la TRIP11 humana

Utilizando el polipéptido parcial de la TRIP11 humana (SEQ ID NO: 55; región de aminoácidos 236 a 1023 de la SEQ ID NO: 47) preparada en el Ejemplo D-2, se midió de la misma manera que en el Ejemplo D-3 el título de anticuerpos IgG de los sueros de humano, canino y felino que reaccionan con el polipéptido.

50 Se llevó a cabo el diagnóstico utilizando suero de ser humano sano. De la misma manera que en el Ejemplo D-3 (4), se utilizó como control positivo antígeno de ovoalbúmina. Como resultado, se detectó el valor de absorbancia en el caso en donde la ovoalbúmina estaba inmovilizada en una fase sólida, mientras que casi no se detectó el valor de absorbancia en el caso en donde estaba inmovilizado en una fase sólida el polipéptido parcial de la TRIP11 humana.

55 De forma similar, en perros y gatos sanos la absorbancia a 450 nm casi no se detectó en el caso en donde el polipéptido está inmovilizado en una fase sólida.

60 Por otro lado, el 21 de junio de 2007 el Paciente Canino 11 (Shih Tzu) se sometió a la extirpación de un adenocarcinoma mamario. De acuerdo con el diagnóstico patológico utilizando el tejido extirpado, el tejido de glándula mamaria contenía células invasivas elevadamente atípicas, que creció para formar hiperplasia adenomatosa que mostraba estructuras masivas grandes y pequeñas. Por consiguiente, este paciente se diagnosticó con tumor maligno. En el Paciente Canino 11, la absorbancia a 450 nm era de 0,19. El diagnóstico de malignidad se llevó a cabo utilizando 310 muestras de suero adicionales que se habían diagnosticado como malignas mediante el diagnóstico patológico. Como resultado, diagnosticando como maligna una muestra que mostraba el doble del valor promedio de las muestras de canino sano, se pudieron diagnosticar 74 muestras de

forma satisfactoria como malignas, es decir el 23,8 % de los casos malignos. Además, en el Paciente Felino 3 (raza mixta), que el 3 de abril de 2007 se sometió a la extirpación de un adenocarcinoma mamario, la absorbancia a 450 nm era de 0,06.

- 5 Los resultados descritos anteriormente indican que utilizando un polipéptido obtenido de la TRIP11 humana también se puede lograr de forma similar el diagnóstico en seres humanos, perros y gatos.

Adicionalmente, se sometieron al diagnóstico utilizando la proteína humana recombinante de la misma manera que la proteína canina recombinante, muestras de efusión pleural y de ascitis recolectadas de perros con cáncer  
10 terminal. Como resultado, se pudieron detectar valores similares a los detectados en las muestras de suero y, por consiguiente, se pudo lograr de forma satisfactoria el diagnóstico del cáncer.

Además, se llevó a cabo el diagnóstico de la misma manera que se describe anteriormente utilizando una TRIP11 humana de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 47 preparada en el Ejemplo D-2.  
15 Como resultado, se reveló que el diagnóstico también se puede lograr de forma similar en seres humanos, perros y gatos.

Ejemplo D-5: diagnóstico del cáncer midiendo el polipéptido antigénico (1)

20 Se inmunizaron ratones y conejos con la proteína canina recombinante que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 54 preparada en el Ejemplo D-2, para obtener un anticuerpo específico para este antígeno. Utilizando este anticuerpo policlonal, se llevó a cabo mediante ELISA de tipo sándwich la detección del polipéptido antigénico *per se* contenido en el suero procedente de un cuerpo vivo portador de cáncer. Utilizando un anticuerpo anti IgG de ratón, se midió mediante ELISA de tipo sándwich la cantidad de la proteína en suero que reacciona de forma específica  
25 con el anticuerpo policlonal específico preparado frente a la proteína preparada.

Del mismo modo que para la inmovilización de un anticuerpo primario en una fase sólida, se añadieron 100 µl/pocillo del antisuero de conejo diluido 20 veces con solución salina tamponada con fosfato a una placa de 96 pocillos Inmovilizer Amino (fabricada por Nunc), y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Del mismo  
30 modo que para el bloqueo, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de solución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,3) que contenía BSA al 0,5 % (seroalbúmina bovina, fabricada por Sigma Aldrich Japón) (denominado en lo sucesivo en este documento como solución de bloqueo) y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron a la placa 100 µl/pocillo del suero procedente del cuerpo portador de cáncer diluido con la solución de  
35 bloqueo y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, para dejar que transcurra la reacción. Al igual que para el suero diluido, se prepararon diluciones en serie con factor 10 que variaban de 10 a 1.000 veces. Tras lavar 3 veces los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (fabricado por Wako Pure Chemicals) (denominado en lo sucesivo en este documento como PBS-T), se añadieron a los mismos  
40 100 µl/pocillo de antisuero de ratón diluido 200 veces con la solución de bloqueo, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar 3 veces los pocillos con PBS-T, se añadieron a los mismos 100 µl/pocillo de anticuerpo para IgG de ratón conjugado a HRP (cabra anti ratón conjugado con HRP estabilizado: fabricado por PIERCE) diluido 2000 con la solución de bloqueo como anticuerpo terciario, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para dejar que transcurra la reacción. Tras lavar los pocillos 3  
45 veces con PBS-T, se añadieron los mismos 100 µl/pocillo de un sustrato de HRP, TMB (TMB (tetrametilbencidina) 1-Step Turbo, fabricado por PIERCE), y se dejó que la reacción enzima-sustrato transcurra a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, se finalizó la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de solución de ácido sulfúrico 0,5 M (fabricado por Sigma Aldrich Japón) y después se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Como control se midieron de la misma manera que se describe anteriormente una placa en la que no se inmovilizó el anticuerpo de conejo y una placa con la que no reaccionó el suero procedente de un cuerpo portador  
50 de cáncer.

Como resultado, se detectó el polipéptido en perros y gatos portadores de cáncer que padecían liomiosarcoma cutáneo, cáncer de mama, melanoma maligno y similares, aunque no se detectó el polipéptido en perros sanos, gatos sanos y seres humanos sanos. Por lo tanto, también pueden diagnosticarse cánceres mediante este método en el que se detectó el polipéptido antigénico con un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno el  
55 polipéptido canino recombinante.

Además, se llevó a cabo el diagnóstico de la misma manera que se describe anteriormente utilizando un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno la TRIP11 canina de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 45 preparada en el Ejemplo D-2.  
60

Como resultado, también pueden diagnosticarse cánceres en perros y gatos mediante este método en que se detectó el polipéptido antigénico con un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno una TRIP11 canina de longitud completa.  
65

Ejemplo D-6: diagnóstico del cáncer midiendo el polipéptido antigénico (2)

Se inmunizaron ratones y conejos con la proteína humana recombinante que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 55 preparada en el Ejemplo D-2, para obtener un anticuerpo específico para este antígeno. De la misma manera que en el Ejemplo D-5, se llevó a cabo mediante ELISA de tipo sándwich utilizando este anticuerpo policlonal la detección del polipéptido antigénico *per se* contenido en el suero procedente de un cuerpo portador de cáncer.

Como resultado, se detectó el polipéptido en perros y gatos portadores de cáncer que padecían liomiosarcoma cutáneo, cáncer de mama, melanoma maligno y similares, mientras que no se detectó el polipéptido en perros sanos, gatos sanos y seres humanos sanos. Por consiguiente, también se pudieron diagnosticar cánceres mediante este método en el que el polipéptido antigénico se detectó con un anticuerpo preparado utilizando como inmunógeno el polipéptido humano recombinante.

Además, se llevó a cabo el diagnóstico de la misma manera que se describe anteriormente utilizando un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno la TRIP11 humana de longitud completa que tenía la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 47 preparada en el Ejemplo D-2.

Como resultado, también pudieron diagnosticarse cánceres en perros y gatos mediante este método en que el polipéptido antigénico se detectó con un anticuerpo que se preparó utilizando como inmunógeno una TRIP11 humana de longitud completa.

Ejemplo E-1: diagnóstico combinado del cáncer utilizando cuatro polipéptidos antigénicos (1)

(1) Diagnóstico del cáncer en perros

Utilizando el polipéptido canino recombinante (SEQ ID NO: 2) preparado en el Ejemplo A-2, la proteína calmegina canina (SEQ ID NO: 16) preparada en el Ejemplo B-2, el polipéptido de la CEP canina preparada en el Ejemplo C-2 de longitud completa (SEQ ID NO: 26 o 42) o parcial (SEQ ID NO: 35; región de los aminoácidos 1514 a 2339 de la SEQ ID NO: 26), el polipéptido de la TRIP11 canina preparada en el Ejemplo D-2 de longitud completa (SEQ ID NO: 45) o parcial (SEQ ID NO: 54; región de los aminoácidos 237 a 1023 de la SEQ ID NO: 45) y el anticuerpo anti IgG de perro, se midió el título de anticuerpos IgG del suero que reaccionaban de forma específica con cualquiera de las proteínas o polipéptidos mencionados anteriormente.

Mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que presentaba el doble del valor promedio de las muestras de caninos sanos, pudieron diagnosticarse de forma satisfactoria como malignas 272 muestras, es decir 87,5 % de los casos malignos. El cuerpo vivo sujeto se diagnosticó como maligno cuando una cualquiera de las 4 proteínas y polipéptidos indicaron malignidad (lo mismo se aplicará en lo sucesivo en este documento). Los detalles de estas 272 muestras de cáncer son como sigue. Cabe señalar que el siguiente número de cada caso de cáncer es un total acumulativo, dado que algunas mezclas contenían múltiples primarios.

Melanoma maligno, 10 casos; linfoma, 13 casos; feocromocitoma, 1 caso; inflamación supurante, 1 caso; tumor de células de la granulosa, 1 caso; carcinoma hepatocelular, 5 casos; angioma, 1 caso; tumor testicular maligno, 8 casos; tumor intraoral, 4 casos; adenocarcinoma perianal, 14 casos; osteosarcoma, 5 casos; fibrosarcoma, 9 casos; carcinoma ductal, 10 casos; condrosarcoma, 2 casos; adenocarcinoma mamario, 56 casos; adenocarcinoma mamario combinado, 26 casos; cáncer de pulmón, 2 casos; carcinoma sebáceo, 2 casos; adenocarcinoma nasal, 2 casos; mastocitoma, 37 casos; tumor adrenomedular, 1 caso; liomiosarcoma, 2 casos; carcinoma de células escamosas, 11 casos; leucemia linfocítica crónica, 1 caso; sarcoma indiferenciado, 2 casos; tumor mixto maligno, 2 casos; tumor en el segmento posterior del lóbulo izquierdo del pulmón, 1 caso; tumor en la región infra axilar derecha, 1 caso; tumor en el codo de la pata delantera derecha, 1 caso; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales), 1 caso; melanoma maligno metastásico, 3 casos; melanoma maligno amelanítico, 1 caso; adenocarcinoma de intestino grueso, 1 caso; plasmocitoma, 1 caso; sarcoma histiocítico, 1 caso; liposarcoma, 1 caso; sarcoma poco diferenciado, 1 caso; sarcoma sinovial, 1 caso; hemangiopericitoma maligno, 1 caso; carcinoma de glándulas sudoríparas apocrino, 3 casos; adenocarcinoma bronquial, 1 caso; germinoma, 1 caso; histiocitoma fibroso maligno, 1 caso; epiteloma maligno metastásico, 1 caso; carcinoma ductal mamario, 1 caso; angiosarcoma, 1 caso; adenocarcinoma mamario tubular, 1 caso; tricoepitelioma invasivo, 1 caso; cáncer de próstata, 1 caso; sarcoma de partes blandas (tumor de células fusiformes), 1 caso; adenocarcinoma ceruminoso, 1 caso; linfoma multicéntrico, 2 casos; tricoepitelioma invasivo, 1 caso; adenocarcinoma de la cavidad anal, 1 caso; carcinoma apocrino, 1 caso; adenocarcinoma gástrico, 1 caso; seminoma, 1 caso; carcinoma de células basales, 1 caso; hemangiopericitoma, 4 casos; mixosarcoma, 1 caso; epiteloma sebáceo, 1 caso; tumor esplénico, 1 caso.

(2) Diagnóstico del cáncer en gatos

A continuación, se diagnosticaron gatos portadores de cáncer y gatos sanos. Utilizando los 4 tipos de polipéptidos antigénicos caninos descritos anteriormente y el anticuerpo anti IgG de gato, se midió de la misma manera que se describe anteriormente el título de anticuerpos IgG de un suero felino que reacciona de forma específica con

cualquiera de los polipéptidos. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG de gato conjugado con HRP (FRACCIÓN IgG DE CABRA para IgG de GATO CONJUGADO A PEROXIDASA (MOLECULA COMPLETA): fabricado por CAPPEL RESERCH REAGENTS) diluido 8.000 veces con la solución de bloqueo.

- 5 Entre un total de 17 muestras utilizadas en el diagnóstico del cáncer, mediante el diagnóstico patológico utilizando el tejido tumoral extirpado se diagnosticaron de forma definitiva como malignas 11 muestras. Mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que muestra el doble del valor promedio de las muestras de felinos sanos, se pudieron diagnosticar de forma satisfactoria como malignas 9 muestras, es decir el 81,8 % de los casos malignos.

10 Ejemplo E-2: diagnóstico combinado del cáncer utilizando cuatro polipéptidos antigénicos (2)

(1) Diagnóstico del cáncer en perros

- 15 Utilizando el polipéptido humano recombinante (SEQ ID NO: 4) preparado en el Ejemplo A-2, la proteína calmegina humana (SEQ ID NO: 18) preparada en el Ejemplo B-2, el polipéptido de la CEP humana preparado en el Ejemplo C-2 de longitud completa (SEQ ID NO: 28 ) o parcial (SEQ ID NO: 36; región de los aminoácidos 1513 a 2325 de la SEQ ID NO: 28), el polipéptido de la TRIP11 humana preparado en el Ejemplo D-2, de longitud completa (SEQ ID NO: 47) o parcial (SEQ D NO: 55; región de los aminoácidos 236 a 1023 de la SEQ ID NO: 47) y el anticuerpo anti IgG de perro, se midió de la misma manera que se describe anteriormente el título de anticuerpos IgG del suero que reaccionan de forma específica con cualquiera de las proteínas o polipéptidos mencionados anteriormente.

Mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que muestra el doble del valor promedio de las muestras de caninos sanos, se pudieron diagnosticar de forma satisfactoria como malignas 268 muestras, es decir el 86,2 % de los casos malignos.

25

(2) Diagnóstico del cáncer en gatos

- 30 A continuación se diagnosticaron gatos portadores de cáncer y gatos sanos. Utilizando los 4 tipos de polipéptidos antigénicos caninos descritos anteriormente y el anticuerpo anti IgG de gato, se midió de la misma manera que se describe anteriormente el título de anticuerpos IgG de suero felino que reaccionan de forma específica con cualquiera de los polipéptidos. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG de gato conjugado con HRP (FRACCIÓN IgG DE CABRA para IgG de GATO CONJUGADO CON PEROXIDASA (MOLECULA COMPLETA): fabricado por CAPPEL RESERCH REAGENTS) diluido 8.000 veces con la solución de bloqueo.

- 35 Entre un total de 17 muestras utilizadas en el diagnóstico del cáncer, 11 muestras se diagnosticaron de forma definitiva como malignas mediante diagnóstico patológico utilizando el tejido tumoral extirpado. Mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que muestra el doble del valor promedio de las muestras felinos sanos, se pudieron diagnosticar como malignas de forma satisfactoria 7 muestras, es decir el 63,6 % de los casos malignos.

40 Ejemplo E-3: diagnóstico combinado del cáncer midiendo cuatro polipéptidos antigénicos (1)

- 45 Se inmunizaron ratones y conejos con el polipéptido canino recombinante (SEQ ID NO: 2) preparado en el Ejemplo A-2, la proteína de calmegina canina (SEQ ID NO: 16) preparada en el Ejemplo B-2, el polipéptido de la CEP canina preparado en el Ejemplo C-2 de longitud completa (SEQ ID NO: 26 o 42) o parcial (SEQ ID NO: 35; región de los aminoácidos 1514 a 2339 de la SEQ ID NO: 26) o el polipéptido de la TRIP11 canina preparado en el Ejemplo D-2 de longitud completa (SEQ ID NO: 45) o parcial (SEQ ID NO: 54; región de los aminoácidos 237 a 1023 de la SEQ ID NO: 45), para obtener anticuerpos específicos frente a estos antígenos. De la misma manera que en los Ejemplos A, B, C, D-5, los polipéptidos antigénicos *per se* contenidos en el suero procedente de un cuerpo vivo portador de cáncer se detectaron mediante ELISA de tipo sándwich utilizando los anticuerpos policlonales preparados.

50

Como resultado, este método en que los polipéptidos antigénicos se detectaron utilizando como inmunógeno los anticuerpos preparados utilizando polipéptidos antigénicos caninos, pudo diagnosticar como malignos de forma satisfactoria 252 muestras, es decir el 81,0 % de los casos malignos, mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que muestra el doble del valor promedio de las muestras de caninos sanos. De forma similar, también en gatos pudieron diagnosticarse de forma satisfactoria como malignas 8 muestras, es decir el 72,7 % de los casos malignos, mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que muestra el doble del valor promedio de las muestras de felinos sanos.

55

60 Ejemplo E-4: diagnóstico combinado del cáncer midiendo cuatro polipéptidos antigénicos (2)

60

Se inmunizaron ratones y conejos con el polipéptido humano recombinante (SEQ ID NO: 4) preparado en el Ejemplo A-2, la proteína calmegina humana (SEQ ID NO: 18) preparada en el Ejemplo B-2, el polipéptido de la CEP humana preparado en el Ejemplo C-2 de longitud completa (SEQ ID NO: 28) o parcial (SEQ ID NO: 36; región de los aminoácidos 1513 a 2325 de la SEQ ID NO: 28) o el polipéptido de la TRIP11 humana preparado en el Ejemplo D-2 de longitud completa (SEQ ID NO: 47) o parcial (SEQ ID NO: 55; región de los aminoácidos 236 a 1023 de la SEQ ID NO: 47), para obtener anticuerpos específicos frente a estos antígenos. De la misma manera que en los Ejemplos

65

A, B, C, D-5, los polipéptidos antigénicos *per se* contenidos en el suero procedente de un cuerpo vivo portador de cáncer se detectaron mediante ELISA de tipo sándwich, utilizando los anticuerpos policlonales preparados.

5 Como resultado, este método en que los polipéptidos antigénicos se detectaron utilizando como inmunógeno anticuerpos preparados utilizando polipéptidos antigénicos humanos, pudo diagnosticar de forma satisfactoria como malignas 248 muestras, es decir el 79,7 % de los casos malignos, mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que muestra el doble del valor promedio de las muestras de caninos sanos. De forma similar, también en gatos pudieron diagnosticarse de forma satisfactoria como malignas 7 muestras, es decir el 63,6 % de los casos malignos, mediante el diagnóstico como maligna de una muestra que muestra el doble de valor promedio de las  
10 muestras de felinos sanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> TORAY INDUSTRIES, INC.  
 <120> Método para la detección de un cáncer  
 <130> PF382-PCT  
 20 <160> 59  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 25 <210> 1  
 <211> 1508  
 <212> ADN  
 <213> *Canis familiaris*  
 30 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (17)..(937)  
 <223>  
 35 <400> 1

ES 2 605 646 T3

gcggcccggg	cgggac	atg	gcg	gcg	ctc	tac	gcc	tgc	acc	aag	tgc	cac	cag	52		
		Met	Ala	Ala	Leu	Tyr	Ala	Cys	Thr	Lys	Cys	His	Gln			
		1				5					10					
cgc	ttc	ccc	ttc	gag	gcg	ctg	tct	cag	ggg	cag	cag	ctg	tgc	aag	gaa	100
Arg	Phe	Pro	Phe	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Gly	Gln	Gln	Leu	Cys	Lys	Glu	
		15					20					25				
tgt	cgg	att	gca	cac	cct	gtt	gtg	aag	tgc	acc	tac	tgt	aga	act	gag	148
Cys	Arg	Ile	Ala	His	Pro	Val	Val	Lys	Cys	Thr	Tyr	Cys	Arg	Thr	Glu	
		30					35				40					
tac	cag	caa	gag	agt	aaa	acc	aat	aca	ata	tgc	aaa	aaa	tgt	gct	cag	196
Tyr	Gln	Gln	Glu	Ser	Lys	Thr	Asn	Thr	Ile	Cys	Lys	Lys	Cys	Ala	Gln	
45					50					55					60	
aat	gtg	cag	tta	tat	gga	acg	ccc	aaa	cct	tgt	cag	tac	tgc	aac	ata	244
Asn	Val	Gln	Leu	Tyr	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro	Cys	Gln	Tyr	Cys	Asn	Ile	
				65					70					75		
att	gca	gca	ttt	att	ggc	aac	aaa	tgc	cag	cga	tgc	acg	aat	tca	gag	292
Ile	Ala	Ala	Phe	Ile	Gly	Asn	Lys	Cys	Gln	Arg	Cys	Thr	Asn	Ser	Glu	
			80					85					90			
aag	aag	tat	gga	cca	cca	tat	tca	tgt	gaa	cag	tgt	aaa	caa	cag	tgt	340
Lys	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Tyr	Ser	Cys	Glu	Gln	Cys	Lys	Gln	Gln	Cys	
		95					100					105				
gca	ttt	gac	agg	aaa	gat	gat	aga	aag	aag	gta	gat	ggg	aaa	ttg	ctg	388
Ala	Phe	Asp	Arg	Lys	Asp	Asp	Arg	Lys	Lys	Val	Asp	Gly	Lys	Leu	Leu	
	110						115				120					
tgt	tgg	ctg	tgc	aca	ctt	tca	tac	aaa	cgg	gtc	ctt	caa	aag	acc	aaa	436
Cys	Trp	Leu	Cys	Thr	Leu	Ser	Tyr	Lys	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Thr	Lys	
125					130					135					140	
gag	cag	agg	aaa	cat	ctg	agc	agc	tct	tcc	cgt	gcc	agc	cac	cag	gag	484
Glu	Gln	Arg	Lys	His	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	His	Gln	Glu	

ES 2 605 646 T3

	145		150		155	
aag gaa cag tat cga ctg agt ggt ggc agc cat tat aac agc cag aaa						532
Lys Glu Gln Tyr Arg Leu Ser Gly Gly Ser His Tyr Asn Ser Gln Lys						
	160		165		170	
aca ctt tct acg tct tca att caa aat gaa atc cca aag aaa aaa tcc						580
Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ile Gln Asn Glu Ile Pro Lys Lys Lys Ser						
	175		180		185	
aag ttt gag tca atc aca act aat gga gac agc ttt tcc cca gac ctg						628
Lys Phe Glu Ser Ile Thr Thr Asn Gly Asp Ser Phe Ser Pro Asp Leu						
	190		195		200	
gct ctg gac tca cca ggc act gac cac ttt gtc atc att gcc cag ctg						676
Ala Leu Asp Ser Pro Gly Thr Asp His Phe Val Ile Ile Ala Gln Leu						
	205		210		215	220
aag gaa gaa gtg gcc act ttg aag aag atg ctg cat caa aag gat caa						724
Lys Glu Glu Val Ala Thr Leu Lys Lys Met Leu His Gln Lys Asp Gln						
	225		230		235	
atg att tta gag aaa gag aag aag atc aca gag ttg aag gct gat ttt						772
Met Ile Leu Glu Lys Glu Lys Lys Ile Thr Glu Leu Lys Ala Asp Phe						
	240		245		250	
caa tac caa gaa tct cag atg aga gcc aaa atg aac cag atg gag aaa						820
Gln Tyr Gln Glu Ser Gln Met Arg Ala Lys Met Asn Gln Met Glu Lys						
	255		260		265	
act cac aaa gaa gtc aca gag caa ttg cag gcc aaa aac cga gaa ctc						868
Thr His Lys Glu Val Thr Glu Gln Leu Gln Ala Lys Asn Arg Glu Leu						
	270		275		280	
ctg aag cag gca gct gcc ttg tcc aag agc aag aag tca gag aag tca						916
Leu Lys Gln Ala Ala Ala Leu Ser Lys Ser Lys Lys Ser Glu Lys Ser						
	285		290		295	300
gga gct ata act tct cca tga gagaccataa ggaggcttcc agccacagca						967
Gly Ala Ile Thr Ser Pro						
	305					
aaggggtttc ctgggttagg gttggtggcc tggctgttat ctgggaattg cccacgctcc						1027
cggaagggc ctgtcccagt cggtctctgcc ctaccgcccgc agcgtcccca cctggctgaa						1087
gctgacgtcc gacgacgtga aggagcagat ctacaaactg gccaagaagg gtctgactcc						1147
ctcgcagatc ggtgtgatcc tgagagactc ccattggtgtt gcacaagtac gttttgtgac						1207
aggcaataaaa atcttgagaa ttcttaagtc caagggactt gcacctgac tccctgagga						1267
totgtaccat ttgattaaga aagctgttgc tgttcogaaag catcttgaga ggaacagaaa						1327
ggataaggat gccaaattcc gactgattct gattgagagc cgtattcacc gattggctcg						1387
atattataag accaaaagag ttctccctcc caattggaaa tacgagtcac ccacagcctc						1447
tgcctggtc gcataaattt ggctatgtac tcaagcaata aatcattgt ctactagaaa						1507
a						1508

ES 2 605 646 T3

<210> 2  
 <211> 306  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 2

```

Met Ala Ala Leu Tyr Ala Cys Thr Lys Cys His Gln Arg Phe Pro Phe
 1                               5 10 15

Glu Ala Leu Ser Gln Gly Gln Gln Leu Cys Lys Glu Cys Arg Ile Ala
 20                               25 30

His Pro Val Val Lys Cys Thr Tyr Cys Arg Thr Glu Tyr Gln Gln Glu
 35                               40 45

Ser Lys Thr Asn Thr Ile Cys Lys Lys Cys Ala Gln Asn Val Gln Leu
 50                               55 60

Tyr Gly Thr Pro Lys Pro Cys Gln Tyr Cys Asn Ile Ile Ala Ala Phe
 65                               70 75 80

Ile Gly Asn Lys Cys Gln Arg Cys Thr Asn Ser Glu Lys Lys Tyr Gly
 85                               90 95

Pro Pro Tyr Ser Cys Glu Gln Cys Lys Gln Gln Cys Ala Phe Asp Arg
100                               105 110

Lys Asp Asp Arg Lys Lys Val Asp Gly Lys Leu Leu Cys Trp Leu Cys
115                               120 125

Thr Leu Ser Tyr Lys Arg Val Leu Gln Lys Thr Lys Glu Gln Arg Lys
130                               135 140

His Leu Ser Ser Ser Ser Arg Ala Ser His Gln Glu Lys Glu Gln Tyr
145                               150 155 160

Arg Leu Ser Gly Gly Ser His Tyr Asn Ser Gln Lys Thr Leu Ser Thr
165                               170 175

Ser Ser Ile Gln Asn Glu Ile Pro Lys Lys Lys Ser Lys Phe Glu Ser
180                               185 190

Ile Thr Thr Asn Gly Asp Ser Phe Ser Pro Asp Leu Ala Leu Asp Ser
195                               200 205
    
```

ES 2 605 646 T3

Pro Gly Thr Asp His Phe Val Ile Ile Ala Gln Leu Lys Glu Glu Val  
 210 215 220

Ala Thr Leu Lys Lys Met Leu His Gln Lys Asp Gln Met Ile Leu Glu  
 225 230 235 240

Lys Glu Lys Lys Ile Thr Glu Leu Lys Ala Asp Phe Gln Tyr Gln Glu  
 245 250 255

Ser Gln Met Arg Ala Lys Met Asn Gln Met Glu Lys Thr His Lys Glu  
 260 265 270

Val Thr Glu Gln Leu Gln Ala Lys Asn Arg Glu Leu Leu Lys Gln Ala  
 275 280 285

Ala Ala Leu Ser Lys Ser Lys Lys Ser Glu Lys Ser Gly Ala Ile Thr  
 290 295 300

Ser Pro  
 305

- <210> 3
- <211> 2161
- 5 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (103)..(1026)
- <223>
- <400> 3

ES 2 605 646 T3

gccgcagcca gcagcctgca gccgccgccg ggttgtgcct cagactgtca gataaatcgg	60
cgggccgggc cggcgggtcg gtgagcgcgg cccgggccgg ac atg gcg gcg ctc	114
	Met Ala Ala Leu
	1
tac gcc tgc acc aag tgc cac cag cgc ttc ccc ttc gag gcg ctg tct	162
Tyr Ala Cys Thr Lys Cys His Gln Arg Phe Pro Phe Glu Ala Leu Ser	
5 10 15 20	
cag ggg cag cag ctg tgc aag gaa tgt cgg att gca cac cct gtt gtg	210
Gln Gly Gln Gln Leu Cys Lys Glu Cys Arg Ile Ala His Pro Val Val	
25 30 35	
aag tgc acc tac tgc agg act gag tac cag cag gag agt aaa acc aat	258
Lys Cys Thr Tyr Cys Arg Thr Glu Tyr Gln Gln Glu Ser Lys Thr Asn	
40 45 50	
aca ata tgc aag aaa tgt gct cag aac gtg cag ttg tat gga acg ccc	306
Thr Ile Cys Lys Lys Cys Ala Gln Asn Val Gln Leu Tyr Gly Thr Pro	
55 60 65	

ES 2 605 646 T3

aaa cct tgt cag tat tgc aac ata att gca gca ttt att ggg aat aaa 354  
 Lys Pro Cys Gln Tyr Cys Asn Ile Ile Ala Ala Phe Ile Gly Asn Lys  
 70 75 80

tgc cag cgc tgc aca aat tca gaa aag aag tat gga cca ccc tat tct 402  
 Cys Gln Arg Cys Thr Asn Ser Glu Lys Lys Tyr Gly Pro Pro Tyr Ser  
 85 90 95 100

tgt gaa cag tgc aag cag cag tgt gca ttt gac agg aaa gat gat aga 450  
 Cys Glu Gln Cys Lys Gln Gln Cys Ala Phe Asp Arg Lys Asp Asp Arg  
 105 110 115

aag aag gta gat ggg aaa ttg ctg tgc tgg ctg tgc aca ctt tca tac 498  
 Lys Lys Val Asp Gly Lys Leu Leu Cys Trp Leu Cys Thr Leu Ser Tyr  
 120 125 130

aaa cgg gtc ctt cag aag acc aaa gag cag agg aaa cac ctg agt agc 546  
 Lys Arg Val Leu Gln Lys Thr Lys Glu Gln Arg Lys His Leu Ser Ser  
 135 140 145

tct tct cgt gct ggc cac cag gag aag gag cag tat agt cgc ctg agt 594  
 Ser Ser Arg Ala Gly His Gln Glu Lys Glu Gln Tyr Ser Arg Leu Ser  
 150 155 160

ggt ggt ggc cat tat aac agc cag aaa aca ctt tct aca tct tca att 642  
 Gly Gly Gly His Tyr Asn Ser Gln Lys Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ile  
 165 170 175 180

caa aat gaa atc cca aag aaa aag tcc aag ttt gag tca atc aca act 690  
 Gln Asn Glu Ile Pro Lys Lys Lys Ser Lys Phe Glu Ser Ile Thr Thr  
 185 190 195

aat gga gac agc ttc tcc cca gac ctg gct ctg gac tca cca ggc act 738  
 Asn Gly Asp Ser Phe Ser Pro Asp Leu Ala Leu Asp Ser Pro Gly Thr  
 200 205 210

gac cac ttt gtc atc att gcc caa ctg aag gaa gaa gtg gct acc ctg 786  
 Asp His Phe Val Ile Ile Ala Gln Leu Lys Glu Glu Val Ala Thr Leu  
 215 220 225

aag aag atg ttg cat caa aag gat caa atg att tta gag aaa gag aag 834  
 Lys Lys Met Leu His Gln Lys Asp Gln Met Ile Leu Glu Lys Glu Lys  
 230 235 240

aag att aca gag ttg aag gct gat ttt cag tac cag gaa tcg cag atg 882  
 Lys Ile Thr Glu Leu Lys Ala Asp Phe Gln Tyr Gln Glu Ser Gln Met  
 245 250 255 260

aga gcc aaa atg aac cag atg gag aaa acc cac aaa gaa gtc aca gaa 930  
 Arg Ala Lys Met Asn Gln Met Glu Lys Thr His Lys Glu Val Thr Glu  
 265 270 275

caa ctg cag gcc aaa aac cga gag ctc ctg aag cag gca gct gct ttg 978  
 Gln Leu Gln Ala Lys Asn Arg Glu Leu Leu Lys Gln Ala Ala Ala Leu  
 280 285 290

tcc aag agc aag aag tca gag aag tca gga gct ata acc tct cca tga 1026  
 Ser Lys Ser Lys Lys Ser Glu Lys Ser Gly Ala Ile Thr Ser Pro  
 295 300 305

cagacctcaa ggaggctccc tagcaacagc aaatggagtt gtccagggtt agggttggag 1086

ES 2 605 646 T3

acctggctgt tctgtgggaa ttgcaagctt tottaagaaa tctctatfff attacagtta 1146  
 tccttctttg tgcgattgca gtgggctgaa tggaaacacc tggtttgtgc tgtgttagac 1206  
 tgcattgcttg agtggttggg atttcaagct cgctctcttt ctctcactat taggactttt 1266  
 cttttctctt ttctctctct ctctatfff gttctattct tttttttct tttttctttt 1326  
 tttttttttt ttttttttg tgggtgctac tgctcagtgt aatgtgcaga atgatttgtt 1386  
 ttttgttttt tttttttttt tttggctctt cattgcatcc tgccataccc atgagcaaac 1446  
 agtttggcat taattatata tcaactgccac cctctgaact ttgaaaactg ccatcttcag 1506  
 acttgggtata atggaagagg ctttctctct ccaataaac ttttgcctca ggtatactc 1566  
 ttcggttttt ttccagatgt attatgtatg aactttgtac tatgtatagc cagagtftta 1626  
 tttatftttt aaaaaagaaa cttttctctg ataaaggaat aatggtggtc tagctagttc 1686  
 ttgtaaaagt gatgcctctt gaaaaaaaaac agtctctattc actagctfttt agtaaaagaa 1746  
 tcagatcttt tctttctctg taccttggag tottaaaaaac tgattgctaa ggtgaaacaa 1806  
 ttcaatgcat aagtatggag ctaagtgcct tttggaggat ttcttgggaag agcatttatg 1866  
 gagatactta agggaggtag caaagatttg aaccgtctgt ctttttaagt aagggcagaa 1926  
 agcaaggttg tccaggttgt actggacact tctctcccca cccctttctt gattgtftta 1986  
 tgtgattgat tftaaattct cacactgcc a tttctfttaa aaataaaatc ctttatttgc 2046  
 ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2106  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2161

<210> 4  
 <211> 307  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

5

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

10

ES 2 605 646 T3

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

305

5	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 5 aattaaccct cactaaaggg	20
15	<210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 6 taatacgact cactatagg	19
25	<210> 7 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 7 agctgtgcaa ggaatgctc	18
40	<210> 8 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 8 ccattagttg tgattgac	18
50	<210> 9 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de GAPDH	
55	<400> 9 gggctgcttt taactctg	18
60	<210> 10 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Cebador de GAPDH	

ES 2 605 646 T3

	<400> 10 ccaggaaatg agcttgac	18
5	<210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 11 atcatatggc ggcgctctac gc	22
15	<210> 12 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 12 cgctcgagtg gagaagttat agctc	25
25	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 13 gatatcatgg cggcgctcta cgc	23
40	<210> 14 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 14 gaattctcat ggagaggta tagc	24
	<210> 15 <211> 2326 <212> ADN <213> <i>Canis familiaris</i>	
50	<220> <221> CDS <222> (62)..(1894) <223>	
55	<400> 15	

ES 2 605 646 T3

cagcgcctcg gacatcggag ctgccgctgc cgaacacggg cccgcaacac aggtaatcag 60

t atg cat ttc caa agc ttt tgg cta tgt ctg gga ctt ctg ttc atc tca 109  
 Met His Phe Gln Ser Phe Trp Leu Cys Leu Gly Leu Leu Phe Ile Ser  
 1 5 10 15

gtt aat gca gaa ttt atg gat gat gat gtt gag atg gaa gat ttt gat 157  
 Val Asn Ala Glu Phe Met Asp Asp Asp Val Glu Met Glu Asp Phe Asp  
 20 25 30

gaa aat tca gaa gag att gat gtt aat gaa ggt gaa ctc ccc tca gag 205  
 Glu Asn Ser Glu Glu Ile Asp Val Asn Glu Gly Glu Leu Pro Ser Glu  
 35 40 45

att aat tat aag aca cct cag cct atg gga gaa gta tat ttt aca gaa 253  
 Ile Asn Tyr Lys Thr Pro Gln Pro Met Gly Glu Val Tyr Phe Thr Glu  
 50 55 60

act ttt gat agt gga agg ttg gct ggg tgg gtc tta tca aaa gca aag 301  
 Thr Phe Asp Ser Gly Arg Leu Ala Gly Trp Val Leu Ser Lys Ala Lys  
 65 70 75 80

aaa gat gat aca gat gca gag att tcc ata tat gat gga aga tgg gaa 349  
 Lys Asp Asp Thr Asp Ala Glu Ile Ser Ile Tyr Asp Gly Arg Trp Glu  
 85 90 95

ata gaa gaa ttg aaa gaa aac cga gtg cct ggt gac aga ggg ctg gta 397  
 Ile Glu Glu Leu Lys Glu Asn Arg Val Pro Gly Asp Arg Gly Leu Val  
 100 105 110

ctg aaa tct aga gca aag cat cat gca ata gct gct gta tta gca aaa 445  
 Leu Lys Ser Arg Ala Lys His His Ala Ile Ala Ala Val Leu Ala Lys  
 115 120 125

ccc ttc att ttt gct gac aaa ccc ttg atc gtt caa tat gaa gta aat 493  
 Pro Phe Ile Phe Ala Asp Lys Pro Leu Ile Val Gln Tyr Glu Val Asn  
 130 135 140

ttt caa gat ggt att gat tgt gga ggt gca tac att aaa ctc cta gca 541  
 Phe Gln Asp Gly Ile Asp Cys Gly Gly Ala Tyr Ile Lys Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

gac act gat ggt ttg aat ctg gaa aac ttt tat gat aaa aca tcc tat 589  
 Asp Thr Asp Gly Leu Asn Leu Glu Asn Phe Tyr Asp Lys Thr Ser Tyr  
 165 170 175

acc att atg ttt gga cca gat aaa tgt gga gaa gat tat aaa ctt cat 637  
 Thr Ile Met Phe Gly Pro Asp Lys Cys Gly Glu Asp Tyr Lys Leu His  
 180 185 190

ES 2 605 646 T3

ttc atc ttc aga cac aaa cat cct aaa act gga gtt ttt gaa gag aaa	685
Phe Ile Phe Arg His Lys His Pro Lys Thr Gly Val Phe Glu Glu Lys	
195 200 205	
cat gcc aaa cct cca gat gta gac ctt aaa aag ttc ttt aca gac agg	733
His Ala Lys Pro Pro Asp Val Asp Leu Lys Lys Phe Phe Thr Asp Arg	
210 215 220	
aag act cat ctt tat acc ctt gtg atg aat cca gat gac aca ttt gaa	781
Lys Thr His Leu Tyr Thr Leu Val Met Asn Pro Asp Asp Thr Phe Glu	
225 230 235 240	
gta cta att gat caa gta gtt gta aac caa gga agc ctc cta gaa gat	829
Val Leu Ile Asp Gln Val Val Val Asn Gln Gly Ser Leu Leu Glu Asp	
245 250 255	
gtg gtt cct cct atc aat cct ccc aaa gaa att gaa gac ccc agt gat	877
Val Val Pro Pro Ile Asn Pro Pro Lys Glu Ile Glu Asp Pro Ser Asp	
260 265 270	
aaa aag cct gat gaa tgg gat gaa aga gca aaa atc cct gat cct tct	925
Lys Lys Pro Asp Glu Trp Asp Glu Arg Ala Lys Ile Pro Asp Pro Ser	
275 280 285	
gct gtc aaa cca gaa gac tgg gat gaa agt gaa cct gcc caa ata gaa	973
Ala Val Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Ser Glu Pro Ala Gln Ile Glu	
290 295 300	
gat tta agt gtt gtt aaa cct gat ggc tgg ctt gat gat gaa cca aaa	1021
Asp Leu Ser Val Val Lys Pro Asp Gly Trp Leu Asp Asp Glu Pro Lys	
305 310 315 320	
ttt att cca gat cca aat gct gaa aaa cct gat gac tgg aat gaa gac	1069
Phe Ile Pro Asp Pro Asn Ala Glu Lys Pro Asp Asp Trp Asn Glu Asp	
325 330 335	
atg gat gga gaa tgg gag gca cct cgt att tct aat cca gca tgt cga	1117
Met Asp Gly Glu Trp Glu Ala Pro Arg Ile Ser Asn Pro Ala Cys Arg	
340 345 350	
att ggg tgt ggt gag tgg tca cct ccc atg ata gat aat ccc aaa tac	1165
Ile Gly Cys Gly Glu Trp Ser Pro Pro Met Ile Asp Asn Pro Lys Tyr	
355 360 365	
aaa gga gta tgg aga cct cca atg ata gat aat cct aac tac cag gga	1213
Lys Gly Val Trp Arg Pro Pro Met Ile Asp Asn Pro Asn Tyr Gln Gly	
370 375 380	
atc tgg agt cct cga aaa atc ccg aat cca gat tat ttt gaa gat gat	1261
Ile Trp Ser Pro Arg Lys Ile Pro Asn Pro Asp Tyr Phe Glu Asp Asp	
385 390 395 400	
cat cca ttt ctt ctg act tct ttc cgt gct ctt ggt tta gag ctt tgg	1309
His Pro Phe Leu Leu Thr Ser Phe Arg Ala Leu Gly Leu Glu Leu Trp	
405 410 415	
tct atg acc tct aat att tac ttt gat aat ttt att atc tgc tcg gaa	1357
Ser Met Thr Ser Asn Ile Tyr Phe Asp Asn Phe Ile Ile Cys Ser Glu	
420 425 430	

ES 2 605 646 T3

aag gaa aca gca gat cgc tgg gct gca gat ggg tgg gga gtg aag ata Lys Glu Thr Ala Asp Arg Trp Ala Ala Asp Gly Trp Gly Val Lys Ile 435 440 445	1405
ctg gta gca aat gct aac gag cct ggt ata ttt aaa cag tta atg gca Leu Val Ala Asn Ala Asn Glu Pro Gly Ile Phe Lys Gln Leu Met Ala 450 455 460	1453
gct gct gaa gag cgc cca tgg ctt tgg ctc att tat ttt gtg aca gca Ala Ala Glu Glu Arg Pro Trp Leu Trp Leu Ile Tyr Phe Val Thr Ala 465 470 475 480	1501
ggg ctt cca ata gca tta att gct tca ttt tgt tgg cca aga aaa gtc Gly Leu Pro Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Cys Trp Pro Arg Lys Val 485 490 495	1549
aag aaa aaa tat gaa gat tca gag tat aaa aag act gac ata tgc aag Lys Lys Lys Tyr Glu Asp Ser Glu Tyr Lys Lys Thr Asp Ile Cys Lys 500 505 510	1597
cca caa aca aag gga gca cta gag caa gaa gtg aag gaa aag aaa gct Pro Gln Thr Lys Gly Ala Leu Glu Gln Glu Val Lys Glu Lys Lys Ala 515 520 525	1645
gcc ctg gag aaa cca gta gac ttg gaa gaa gaa aaa aag caa agt gat Ala Leu Glu Lys Pro Val Asp Leu Glu Glu Glu Lys Lys Gln Ser Asp 530 535 540	1693
ggt gaa act gtt gaa aaa gaa gag gaa gct gaa cct gag gaa aag agt Gly Glu Thr Val Glu Lys Glu Glu Glu Ala Glu Pro Glu Glu Lys Ser 545 550 555 560	1741
gaa gaa gaa att gaa atc ata gaa gga caa gaa gaa ggt aat aaa tca Glu Glu Glu Ile Glu Ile Ile Glu Gly Gln Glu Glu Gly Asn Lys Ser 565 570 575	1789
aat aag tct gga tca gag gat gag atg aag gaa gcg gat gag agc aca Asn Lys Ser Gly Ser Glu Asp Glu Met Lys Glu Ala Asp Glu Ser Thr 580 585 590	1837
gga tct gga gat ggg cca gtg aag tca gtg cgc aaa aga aga gta cga Gly Ser Gly Asp Gly Pro Val Lys Ser Val Arg Lys Arg Arg Val Arg 595 600 605	1885
aag gaa taa actatattca agtattttta attcctgagc gagatatttg Lys Glu 610	1934
gcattctaaa atcagtggtgc cagagctgaa cttgagtcag totgcacatg tttctaatat	1994
ctagcaatgt tattcttttca gacacttatt ttagtctttc ttttcaggaa aaaaaaact	2054
ttcaagttac ctggtctttg gatttagagt aaaaaagagg ggcattgttac gtatcagatt	2114
taagagacta ataccattag aagttacca gttttaatag ttggagaaaag ttttggtttg	2174
tacagagaaa aataatatgc agcagctttg ctgctgtttg aaaatcagtt attggaattt	2234
ccccttaaac agctatacaa caatattact ggtagttcta taataaaaat gagagtgtgt	2294
tctggtgtac agagctaact gcaaaaaaaaa aa	2326

ES 2 605 646 T3

<210> 16  
 <211> 610  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 16

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

ES 2 605 646 T3

His Ala Lys Pro Pro Asp Val Asp Leu Lys Lys Phe Phe Thr Asp Arg  
 210 215 220

Lys Thr His Leu Tyr Thr Leu Val Met Asn Pro Asp Asp Thr Phe Glu  
 225 230 235 240

Val Leu Ile Asp Gln Val Val Val Asn Gln Gly Ser Leu Leu Glu Asp  
 245 250 255

Val Val Pro Pro Ile Asn Pro Pro Lys Glu Ile Glu Asp Pro Ser Asp  
 260 265 270

Lys Lys Pro Asp Glu Trp Asp Glu Arg Ala Lys Ile Pro Asp Pro Ser  
 275 280 285

Ala Val Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Ser Glu Pro Ala Gln Ile Glu  
 290 295 300

Asp Leu Ser Val Val Lys Pro Asp Gly Trp Leu Asp Asp Glu Pro Lys  
 305 310 315 320

Phe Ile Pro Asp Pro Asn Ala Glu Lys Pro Asp Asp Trp Asn Glu Asp  
 325 330 335

Met Asp Gly Glu Trp Glu Ala Pro Arg Ile Ser Asn Pro Ala Cys Arg  
 340 345 350

Ile Gly Cys Gly Glu Trp Ser Pro Pro Met Ile Asp Asn Pro Lys Tyr  
 355 360 365

Lys Gly Val Trp Arg Pro Pro Met Ile Asp Asn Pro Asn Tyr Gln Gly  
 370 375 380

Ile Trp Ser Pro Arg Lys Ile Pro Asn Pro Asp Tyr Phe Glu Asp Asp  
 385 390 395 400

His Pro Phe Leu Leu Thr Ser Phe Arg Ala Leu Gly Leu Glu Leu Trp  
 405 410 415

Ser Met Thr Ser Asn Ile Tyr Phe Asp Asn Phe Ile Ile Cys Ser Glu  
 420 425 430

Lys Glu Thr Ala Asp Arg Trp Ala Ala Asp Gly Trp Gly Val Lys Ile  
 435 440 445

Leu Val Ala Asn Ala Asn Glu Pro Gly Ile Phe Lys Gln Leu Met Ala

ES 2 605 646 T3

450	455	460																	
Ala	Ala	Glu	Glu	Arg	Pro	Trp	Leu	Trp	Leu	Ile	Tyr	Phe	Val	Thr	Ala	465	470	475	480
Gly	Leu	Pro	Ile	Ala	Leu	Ile	Ala	Ser	Phe	Cys	Trp	Pro	Arg	Lys	Val	485	490	495	
Lys	Lys	Lys	Tyr	Glu	Asp	Ser	Glu	Tyr	Lys	Lys	Thr	Asp	Ile	Cys	Lys	500	505	510	
Pro	Gln	Thr	Lys	Gly	Ala	Leu	Glu	Gln	Glu	Val	Lys	Glu	Lys	Lys	Ala	515	520	525	
Ala	Leu	Glu	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	530	535	540	
Gly	Glu	Thr	Val	Glu	Lys	Glu	Glu	Glu	Ala	Glu	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	545	550	555	560
Glu	Glu	Glu	Ile	Glu	Ile	Ile	Glu	Gly	Gln	Glu	Glu	Gly	Asn	Lys	Ser	565	570	575	
Asn	Lys	Ser	Gly	Ser	Glu	Asp	Glu	Met	Lys	Glu	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	580	585	590	
Gly	Ser	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Lys	Ser	Val	Arg	Lys	Arg	Arg	Val	Arg	595	600	605	
Lys	Glu														610				

- <210> 17
- <211> 2710
- 5 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (102)..(1934)
- <223>
- <400> 17

ES 2 605 646 T3

```
cgccggcggg actggtctga agagacgcgg ggacaaagtg gcaacgactt ggacatctga      60
gctgtcactg ccgaaaacag gccgcaagag agataatcaa t atg cat ttc caa gcc      116
                                         Met His Phe Gln Ala
                                         1                               5
ttt tgg cta tgt ttg ggt ctt ctg ttc atc tca att aat gca gaa ttt      164
```

ES 2 605 646 T3

Phe	Trp	Leu	Cys	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Ile	Asn	Ala	Glu	Phe		
				10					15					20			
atg	gat	gat	gat	gtt	gag	acg	gaa	gac	ttt	gaa	gaa	aat	tca	gaa	gaa		212
Met	Asp	Asp	Asp	Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Glu	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu		
			25					30					35				
att	gat	gtt	aat	gaa	agt	gaa	ctt	tcc	tca	gag	att	aaa	tat	aag	aca		260
Ile	Asp	Val	Asn	Glu	Ser	Glu	Leu	Ser	Ser	Glu	Ile	Lys	Tyr	Lys	Thr		
		40					45					50					
cct	caa	cct	ata	gga	gaa	gta	tat	ttt	gca	gaa	act	ttt	gat	agt	gga		308
Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Val	Tyr	Phe	Ala	Glu	Thr	Phe	Asp	Ser	Gly		
	55					60					65						
agg	ttg	gct	gga	tgg	gtc	tta	tca	aaa	gca	aag	aaa	gat	gac	atg	gat		356
Arg	Leu	Ala	Gly	Trp	Val	Leu	Ser	Lys	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Met	Asp		
70					75					80				85			
gag	gaa	att	tca	ata	tac	gat	gga	aga	tgg	gaa	att	gaa	gag	ttg	aaa		404
Glu	Glu	Ile	Ser	Ile	Tyr	Asp	Gly	Arg	Trp	Glu	Ile	Glu	Glu	Leu	Lys		
				90					95					100			
gaa	aac	cag	gta	cct	ggt	gac	aga	gga	ctg	gta	tta	aaa	tct	aga	gca		452
Glu	Asn	Gln	Val	Pro	Gly	Asp	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Lys	Ser	Arg	Ala		
			105					110					115				
aag	cat	cat	gca	ata	tct	gct	gta	tta	gca	aaa	cca	ttc	att	ttt	gct		500
Lys	His	His	Ala	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Lys	Pro	Phe	Ile	Phe	Ala		
			120				125					130					
gat	aaa	ccc	ttg	ata	gtt	caa	tat	gaa	gta	aat	ttt	caa	gat	ggt	att		548
Asp	Lys	Pro	Leu	Ile	Val	Gln	Tyr	Glu	Val	Asn	Phe	Gln	Asp	Gly	Ile		
		135				140					145						
gat	tgt	gga	ggt	gca	tac	att	aaa	ctc	cta	gca	gac	act	gat	gat	ttg		596
Asp	Cys	Gly	Gly	Ala	Tyr	Ile	Lys	Leu	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Asp	Leu		
					155					160					165		
att	ctg	gaa	aac	ttt	tat	gat	aaa	aca	tcc	tat	atc	att	atg	ttt	gga		644
Ile	Leu	Glu	Asn	Phe	Tyr	Asp	Lys	Thr	Ser	Tyr	Ile	Ile	Met	Phe	Gly		
				170					175					180			
cca	gat	aaa	tgt	gga	gaa	gat	tat	aaa	ctt	cat	ttt	atc	ttc	aga	cat		692
Pro	Asp	Lys	Cys	Gly	Glu	Asp	Tyr	Lys	Leu	His	Phe	Ile	Phe	Arg	His		
			185					190					195				
aaa	cat	ccc	aaa	act	gga	gtt	ttc	gaa	gag	aaa	cat	gcc	aaa	cct	cca		740
Lys	His	Pro	Lys	Thr	Gly	Val	Phe	Glu	Glu	Lys	His	Ala	Lys	Pro	Pro		
		200					205					210					
gat	gta	gac	ctt	aaa	aag	ttc	ttt	aca	gac	agg	aag	act	cat	ctt	tat		788
Asp	Val	Asp	Leu	Lys	Lys	Phe	Phe	Thr	Asp	Arg	Lys	Thr	His	Leu	Tyr		
			215			220					225						
acc	ctt	gtg	atg	aat	cca	gat	gac	aca	ttt	gag	gtg	tta	gtt	gat	caa		836
Thr	Leu	Val	Met	Asn	Pro	Asp	Asp	Thr	Phe	Glu	Val	Leu	Val	Asp	Gln		
					235					240					245		
aca	gtt	gta	aac	aaa	gga	agc	ctc	cta	gag	gat	gtg	gtt	cct	cct	atc		884
Thr	Val	Val	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Val	Val	Pro	Pro	Ile		

ES 2 605 646 T3

250					255					260						
aaa	cct	ccc	aaa	gaa	att	gaa	gat	ccc	aat	gat	aaa	aaa	cct	gag	gaa	932
Lys	Pro	Pro	Lys	Glu	Ile	Glu	Asp	Pro	Asn	Asp	Lys	Lys	Pro	Glu	Glu	
			265					270					275			
tgg	gat	gaa	aga	gca	aaa	att	cct	gat	cct	tct	gcc	gtc	aaa	cca	gaa	980
Trp	Asp	Glu	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Lys	Pro	Glu	
		280					285					290				
gac	tgg	gat	gaa	agt	gaa	cct	gcc	caa	ata	gaa	gat	tca	agt	gtt	gtt	1028
Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Glu	Pro	Ala	Gln	Ile	Glu	Asp	Ser	Ser	Val	Val	
	295					300					305					
aaa	cct	gct	ggc	tgg	ctt	gat	gat	gaa	cca	aaa	ttt	atc	cct	gat	cct	1076
Lys	Pro	Ala	Gly	Trp	Leu	Asp	Asp	Glu	Pro	Lys	Phe	Ile	Pro	Asp	Pro	
310					315					320					325	
aat	gct	gaa	aaa	cct	gat	gac	tgg	aat	gaa	gac	acg	gat	gga	gaa	tgg	1124
Asn	Ala	Glu	Lys	Pro	Asp	Asp	Trp	Asn	Glu	Asp	Thr	Asp	Gly	Glu	Trp	
				330					335					340		
gag	gca	cct	cag	att	ctt	aat	cca	gca	tgt	cgg	att	ggg	tgt	ggt	gag	1172
Glu	Ala	Pro	Gln	Ile	Leu	Asn	Pro	Ala	Cys	Arg	Ile	Gly	Cys	Gly	Glu	
			345					350					355			
tgg	aaa	cct	ccc	atg	ata	gat	aac	cca	aaa	tac	aaa	gga	gta	tgg	aga	1220
Trp	Lys	Pro	Pro	Met	Ile	Asp	Asn	Pro	Lys	Tyr	Lys	Gly	Val	Trp	Arg	
		360					365					370				
cct	cca	ctg	gtc	gat	aat	cct	aac	tat	cag	gga	atc	tgg	agt	cct	cga	1268
Pro	Pro	Leu	Val	Asp	Asn	Pro	Asn	Tyr	Gln	Gly	Ile	Trp	Ser	Pro	Arg	
		375				380					385					
aaa	att	cct	aat	cca	gat	tat	ttc	gaa	gat	gat	cat	cca	ttt	ctt	ctg	1316
Lys	Ile	Pro	Asn	Pro	Asp	Tyr	Phe	Glu	Asp	Asp	His	Pro	Phe	Leu	Leu	
390					395					400					405	
act	tct	ttc	agt	gct	ctt	ggt	tta	gag	ctt	tgg	tct	atg	acc	tct	gat	1364
Thr	Ser	Phe	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Glu	Leu	Trp	Ser	Met	Thr	Ser	Asp	
			410					415						420		
atc	tac	ttt	gat	aat	ttt	att	atc	tgt	tcg	gaa	aag	gaa	gta	gca	gat	1412
Ile	Tyr	Phe	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Cys	Ser	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Asp	
			425					430					435			
cac	tgg	gct	gca	gat	ggt	tgg	aga	tgg	aaa	ata	atg	ata	gca	aat	gct	1460
His	Trp	Ala	Ala	Asp	Gly	Trp	Arg	Trp	Lys	Ile	Met	Ile	Ala	Asn	Ala	
		440					445					450				
aat	aag	cct	ggt	gta	tta	aaa	cag	tta	atg	gca	gct	gct	gaa	ggg	cac	1508
Asn	Lys	Pro	Gly	Val	Leu	Lys	Gln	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Glu	Gly	His	
		455				460					465					
cca	tgg	ctt	tgg	ttg	att	tat	ctt	gtg	aca	gca	gga	gtg	cca	ata	gca	1556
Pro	Trp	Leu	Trp	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Thr	Ala	Gly	Val	Pro	Ile	Ala	
470					475					480					485	
tta	att	act	tca	ttt	tgt	tgg	cca	aga	aaa	gta	aag	aaa	aaa	cat	aaa	1604
Leu	Ile	Thr	Ser	Phe	Cys	Trp	Pro	Arg	Lys	Val	Lys	Lys	Lys	His	Lys	
				490					495					500		

ES 2 605 646 T3

gat aca gag tat aaa aaa acc gac ata tgt ata cca caa aca aaa gga	1652
Asp Thr Glu Tyr Lys Lys Thr Asp Ile Cys Ile Pro Gln Thr Lys Gly	
505 510 515	
gta cta gag caa gaa gaa aag gaa gag aaa gca gcc ctg gaa aaa cca	1700
Val Leu Glu Gln Glu Glu Lys Glu Glu Lys Ala Ala Leu Glu Lys Pro	
520 525 530	
atg gac ctg gaa gag gaa aaa aag caa aat gat ggt gaa atg ctt gaa	1748
Met Asp Leu Glu Glu Glu Lys Lys Gln Asn Asp Gly Glu Met Leu Glu	
535 540 545	
aaa gaa gag gaa agt gaa cct gag gaa aag agt gaa gaa gaa att gaa	1796
Lys Glu Glu Glu Ser Glu Pro Glu Glu Lys Ser Glu Glu Glu Ile Glu	
550 555 560 565	
atc ata gaa ggg caa gaa gaa agt aat caa tca aat aag tct ggg tca	1844
Ile Ile Glu Gly Gln Glu Glu Ser Asn Gln Ser Asn Lys Ser Gly Ser	
570 575 580	
gag gat gag atg aaa gaa gca gat gag agc aca gga tct gga gat ggg	1892
Glu Asp Glu Met Lys Glu Ala Asp Glu Ser Thr Gly Ser Gly Asp Gly	
585 590 595	
cag ata aag tca gta cgc aaa aga aga gta cga aag gac taa	1934
Pro Ile Lys Ser Val Arg Lys Arg Arg Val Arg Lys Asp	
600 605 610	
actagattga aatattttta attcccgaga ggatgtttgg cattgtaaaa atcagcatgc	1994
cagacctgaa ctttaatcag tctgcacatc ctgtttctaa tatctagcaa cattatattc	2054
tttcagacat ttatttttagt ccttcatttc cgaggaaaaa gaagcaactt tgaagttacc	2114
tcacttttga atttagaata aaagtggcac attacatatc ggatctaaga gattaatacc	2174
attagaagtt acacagtttt agttgtttgg agatagtttt ggtttgtaca gaacaaaata	2234
atatgtagca gcttcattgc tattggaaaa atcagttatt ggaattcca cttaaatggc	2294
tatacaacaa tataactggt agttctataa taaaaatgag catatgttct gttgtgaaga	2354
gctaaatgca ataaagtttc tgtatggttg tttgattcta tcaacaattg aaagtgttgt	2414
atatgacca catttaccta gtttgtgtca aattatagtt acagtgagtt gtttgcttaa	2474
attatagatt cctttaagga catgccttgt tcataaaatc actggattat attgcagcat	2534
attttacatt tgaatacaag gataatgggt tttatcaaaa caaatgatg tacagatttt	2594
ttttcaagtt tttatagttg ctttatgcc a gagtggttta cccattcac aaaatttctt	2654
atgcatacat tgctattgaa aataaaattt aaatattttt tcactcctgaa aaaaaa	2710

<210> 18  
 <211> 610  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 18

ES 2 605 646 T3

Met His Phe Gln Ala Phe Trp Leu Cys Leu Gly Leu Leu Phe Ile Ser  
1 5 10 15

Ile Asn Ala Glu Phe Met Asp Asp Asp Val Glu Thr Glu Asp Phe Glu  
20 25 30

Glu Asn Ser Glu Glu Ile Asp Val Asn Glu Ser Glu Leu Ser Ser Glu  
35 40 45

Ile Lys Tyr Lys Thr Pro Gln Pro Ile Gly Glu Val Tyr Phe Ala Glu  
50 55 60

Thr Phe Asp Ser Gly Arg Leu Ala Gly Trp Val Leu Ser Lys Ala Lys  
65 70 75 80

Lys Asp Asp Met Asp Glu Glu Ile Ser Ile Tyr Asp Gly Arg Trp Glu  
85 90 95

Ile Glu Glu Leu Lys Glu Asn Gln Val Pro Gly Asp Arg Gly Leu Val  
100 105 110

Leu Lys Ser Arg Ala Lys His His Ala Ile Ser Ala Val Leu Ala Lys  
115 120 125

Pro Phe Ile Phe Ala Asp Lys Pro Leu Ile Val Gln Tyr Glu Val Asn  
130 135 140

Phe Gln Asp Gly Ile Asp Cys Gly Gly Ala Tyr Ile Lys Leu Leu Ala  
145 150 155 160

Asp Thr Asp Asp Leu Ile Leu Glu Asn Phe Tyr Asp Lys Thr Ser Tyr  
165 170 175

Ile Ile Met Phe Gly Pro Asp Lys Cys Gly Glu Asp Tyr Lys Leu His  
180 185 190

Phe Ile Phe Arg His Lys His Pro Lys Thr Gly Val Phe Glu Glu Lys  
195 200 205

His Ala Lys Pro Pro Asp Val Asp Leu Lys Lys Phe Phe Thr Asp Arg  
210 215 220

Lys Thr His Leu Tyr Thr Leu Val Met Asn Pro Asp Asp Thr Phe Glu  
225 230 235 240

ES 2 605 646 T3

Val Leu Val Asp Gln Thr Val Val Asn Lys Gly Ser Leu Leu Glu Asp  
 245 250 255

Val Val Pro Pro Ile Lys Pro Pro Lys Glu Ile Glu Asp Pro Asn Asp  
 260 265 270

Lys Lys Pro Glu Glu Trp Asp Glu Arg Ala Lys Ile Pro Asp Pro Ser  
 275 280 285

Ala Val Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Ser Glu Pro Ala Gln Ile Glu  
 290 295 300

Asp Ser Ser Val Val Lys Pro Ala Gly Trp Leu Asp Asp Glu Pro Lys  
 305 310 315 320

Phe Ile Pro Asp Pro Asn Ala Glu Lys Pro Asp Asp Trp Asn Glu Asp  
 325 330 335

Thr Asp Gly Glu Trp Glu Ala Pro Gln Ile Leu Asn Pro Ala Cys Arg  
 340 345 350

Ile Gly Cys Gly Glu Trp Lys Pro Pro Met Ile Asp Asn Pro Lys Tyr  
 355 360 365

Lys Gly Val Trp Arg Pro Pro Leu Val Asp Asn Pro Asn Tyr Gln Gly  
 370 375 380

Ile Trp Ser Pro Arg Lys Ile Pro Asn Pro Asp Tyr Phe Glu Asp Asp  
 385 390 395 400

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

Ser Met Thr Ser Asp Ile Tyr Phe Asp Asn Phe Ile Ile Cys Ser Glu  
 420 425 430

Lys Glu Val Ala Asp His Trp Ala Ala Asp Gly Trp Arg Trp Lys Ile  
 435 440 445

Met Ile Ala Asn Ala Asn Lys Pro Gly Val Leu Lys Gln Leu Met Ala  
 450 455 460

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

ES 2 605 646 T3

Gly Val Pro Ile Ala Leu Ile Thr Ser Phe Cys Trp Pro Arg Lys Val  
 485 490 495

Lys Lys Lys His Lys Asp Thr Glu Tyr Lys Lys Thr Asp Ile Cys Ile  
 500 505 510

Pro Gln Thr Lys Gly Val Leu Glu Gln Glu Glu Lys Glu Glu Lys Ala  
 515 520 525

Ala Leu Glu Lys Pro Met Asp Leu Glu Glu Glu Lys Lys Gln Asn Asp  
 530 535 540

Gly Glu Met Leu Glu Lys Glu Glu Glu Ser Glu Pro Glu Glu Lys Ser  
 545 550 555 560

Glu Glu Glu Ile Glu Ile Ile Glu Gly Gln Glu Glu Ser Asn Gln Ser  
 565 570 575

Asn Lys Ser Gly Ser Glu Asp Glu Met Lys Glu Ala Asp Glu Ser Thr  
 580 585 590

Gly Ser Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Val Arg Lys Arg Arg Val Arg  
 595 600 605

Lys Asp  
 610

5 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 19  
 gtgatgaatc cagatgac 18

15 <210> 20  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 20  
 ggtcatagac caaagctc 18

25 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

ES 2 605 646 T3

```

<220>
<223> cebador

<400> 21
5 aaggatccat gcatttcaa agc 23

<210> 22
<211> 25
<212> ADN
10 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

15 <400> 22
ccgaattctt attccttgc tactc 25

<210> 23
<211> 26
20 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador
25 <400> 23
gaattcatgc attccaagc ctttg 26

<210> 24
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador
35 <400> 24
ctcgagttag tccttgcgta ctc 23

<210> 25
<211> 7353
40 <212> ADN
<213> Canis familiaris

45 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(7020)
<223>

50 <400> 25

atg aag aaa ggt tct cag caa aag ttt ttg aaa gca aag atg cca cca 48
Met Lys Lys Gly Ser Gln Gln Lys Phe Leu Lys Ala Lys Met Pro Pro
1 5 10 15

```

ES 2 605 646 T3

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

ES 2 605 646 T3

agt cag gac aga caa gaa gct ttt gcg aga ttc agt tta gat gag gta	816
Ser Gln Asp Arg Gln Glu Ala Phe Ala Arg Phe Ser Leu Asp Glu Val	
260 265 270	
gaa aga ctg gaa aga gac ctg gag aag aag aca atg gaa act gaa gag	864
Glu Arg Leu Glu Arg Asp Leu Glu Lys Lys Thr Met Glu Thr Glu Glu	
275 280 285	
ctt agg agt gag cag aca agg ttc ctt gag gaa att aaa agt cag gat	912
Leu Arg Ser Glu Gln Thr Arg Phe Leu Glu Glu Ile Lys Ser Gln Asp	
290 295 300	
aaa ttg aac aaa tca ctg aaa gag gag gcc aga cta caa aaa cag agc	960
Lys Leu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Glu Ala Arg Leu Gln Lys Gln Ser	
305 310 315 320	
tat gag gag ctg gag agt aac cta aac acc aaa aat gaa ttg cta aaa	1008
Tyr Glu Glu Leu Glu Ser Asn Leu Asn Thr Lys Asn Glu Leu Leu Lys	
325 330 335	
cag aag acc atg gaa cta atg cga gca tgt cag aaa cag tat gag atg	1056
Gln Lys Thr Met Glu Leu Met Arg Ala Cys Gln Lys Gln Tyr Glu Met	
340 345 350	
gaa cag gag ttg gcc ttt tat aaa att gat gcc aaa ttt gaa cca cta	1104
Glu Gln Glu Leu Ala Phe Tyr Lys Ile Asp Ala Lys Phe Glu Pro Leu	
355 360 365	
aat tat tac cca tca gag tat gtc gaa att gat aaa acc cca gat gaa	1152
Asn Tyr Tyr Pro Ser Glu Tyr Val Glu Ile Asp Lys Thr Pro Asp Glu	
370 375 380	
agc cct tac att ggc aaa tcc aga tac aag aga aat atg ttc act aca	1200
Ser Pro Tyr Ile Gly Lys Ser Arg Tyr Lys Arg Asn Met Phe Thr Thr	
385 390 395 400	
gag agt tat att att gca aat gcc cag aca gta aag atc aag aag atg	1248
Glu Ser Tyr Ile Ile Ala Asn Ala Gln Thr Val Lys Ile Lys Lys Met	
405 410 415	
gag cta gat gaa ggg gaa caa ctc aga aat gag cac gtg aac ttg gga	1296
Glu Leu Asp Glu Gly Glu Gln Leu Arg Asn Glu His Val Asn Leu Gly	
420 425 430	
gca tcg cca aca gac ata caa ctg gaa gac aaa gaa aaa aaa ata agt	1344
Ala Ser Pro Thr Asp Ile Gln Leu Glu Asp Lys Glu Lys Lys Ile Ser	
435 440 445	
gca gca caa act cga cta tca gaa cta cat gat gaa ata gaa aag gca	1392
Ala Ala Gln Thr Arg Leu Ser Glu Leu His Asp Glu Ile Glu Lys Ala	
450 455 460	
gaa caa caa att tta aga gcc act gaa gaa ttt aaa caa ctg gaa gaa	1440
Glu Gln Gln Ile Leu Arg Ala Thr Glu Glu Phe Lys Gln Leu Glu Glu	
465 470 475 480	
gct ata caa ctt aaa aaa att tca gaa gcg gag aaa gac ctt ctt ttc	1488
Ala Ile Gln Leu Lys Lys Ile Ser Glu Ala Glu Lys Asp Leu Leu Phe	
485 490 495	
aag cag ttg agt ggt agg ata cag ctt ctc aat aaa tta cgc caa gaa	1536

ES 2 605 646 T3

Lys	Gln	Leu	Ser	Gly	Arg	Ile	Gln	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Arg	Gln	Glu		
			500					505					510				
gct	gtg	gat	cta	gaa	aca	cag	atg	gaa	aag	caa	agg	caa	gaa	att	ggt		1584
Ala	Val	Asp	Leu	Glu	Thr	Gln	Met	Glu	Lys	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Gly		
		515					520					525					
gaa	aag	cag	aat	gag	atc	aag	gac	ctg	gaa	ata	gtc	aca	gat	agc	ctg		1632
Glu	Lys	Gln	Asn	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Glu	Ile	Val	Thr	Asp	Ser	Leu		
	530					535					540						
gat	tcc	aga	gac	cca	aaa	cat	tgc	cat	atg	aag	gct	cag	aaa	aga	ggt		1680
Asp	Ser	Arg	Asp	Pro	Lys	His	Cys	His	Met	Lys	Ala	Gln	Lys	Arg	Gly		
	545				550					555					560		
aaa	gaa	caa	caa	ctt	gac	att	atg	aac	aag	cag	tac	aaa	cag	ctt	gaa		1728
Lys	Glu	Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Met	Asn	Lys	Gln	Tyr	Lys	Gln	Leu	Glu		
				565				570						575			
agc	cgt	ttg	gat	gag	ata	ctt	tct	aga	att	gcc	aaa	gaa	act	gaa	gag		1776
Ser	Arg	Leu	Asp	Glu	Ile	Leu	Ser	Arg	Ile	Ala	Lys	Glu	Thr	Glu	Glu		
			580					585						590			
att	aag	gac	ctt	gaa	gaa	cag	ctt	act	gaa	gga	caa	ata	gcc	gca	aac		1824
Ile	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	Glu	Gly	Gln	Ile	Ala	Ala	Asn		
		595					600					605					
gaa	gcc	ctg	aag	aag	gac	tta	gaa	agt	gtc	atc	agt	ggg	ttg	caa	gaa		1872
Glu	Ala	Leu	Lys	Lys	Asp	Leu	Glu	Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Glu		
	610					615					620						
tac	ctg	gag	act	gtc	aaa	ggt	cag	gcc	cgt	cag	gcc	cag	aat	gag	tgc		1920
Tyr	Leu	Glu	Thr	Val	Lys	Gly	Gln	Ala	Arg	Gln	Ala	Gln	Asn	Glu	Cys		
	625				630					635					640		
aga	aag	cta	cag	gat	gag	aag	gag	aca	ttg	ctg	cag	aga	ttg	agt	gag		1968
Arg	Lys	Leu	Gln	Asp	Glu	Lys	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Leu	Ser	Glu		
				645					650					655			
gtc	gag	cag	gag	agg	gac	caa	ctg	gaa	ata	gtg	gcc	ata	gat	gca	gaa		2016
Val	Glu	Gln	Glu	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Ile	Val	Ala	Ile	Asp	Ala	Glu		
			660					665					670				
aat	atg	agg	aag	gag	ctc	gca	gaa	ctg	gag	aat	gcc	ctc	cag	gag	cag		2064
Asn	Met	Arg	Lys	Glu	Leu	Ala	Leu	Glu	Glu	Asn	Ala	Leu	Gln	Glu	Gln		
		675					680					685					
cat	gag	gtg	aat	ata	tct	ctg	cag	cag	acc	cag	gga	gat	ctc	agt	gcc		2112
His	Glu	Val	Asn	Ile	Ser	Leu	Gln	Gln	Thr	Gln	Gly	Asp	Leu	Ser	Ala		
	690					695					700						
tat	gag	gct	gag	cta	gag	gct	cag	ctg	aaa	ata	cgg	gat	gct	gaa	gcc		2160
Tyr	Glu	Ala	Glu	Leu	Glu	Ala	Gln	Leu	Lys	Ile	Arg	Asp	Ala	Glu	Ala		
	705				710					715					720		
aac	cag	ctc	aag	gag	gag	ttg	gaa	aaa	ctt	aga	agg	ttg	agc	cag	tta		2208
Asn	Gln	Leu	Lys	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Leu	Arg	Arg	Leu	Ser	Gln	Leu		
				725				730						735			
gaa	caa	tcg	gcc	ctt	caa	gca	gag	ctt	gag	aag	gaa	aag	caa	gcc	ttc		2256
Glu	Gln	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Gln	Ala	Phe		

ES 2 605 646 T3

				740				745				750					
aag	act	gct	gtc	aaa	aaa	gcc	cag	ctc	tca	gaa	gga	aag	gac	caa	gaa	2304	
Lys	Thr	Ala	Val	Lys	Lys	Ala	Gln	Leu	Ser	Glu	Gly	Lys	Asp	Gln	Glu		
				755				760				765					
aat	agt	gag	ctc	cgc	aca	caa	ctc	caa	cag	ctg	cag	gat	gac	aat	gac	2352	
Asn	Ser	Glu	Leu	Arg	Thr	Gln	Leu	Gln	Gln	Leu	Gln	Asp	Asp	Asn	Asp		
				770				775				780					
cta	ttg	aaa	cag	caa	ctt	aaa	gat	ttc	cag	agt	cac	ctt	aac	cat	gtg	2400	
Leu	Leu	Lys	Gln	Gln	Leu	Lys	Asp	Phe	Gln	Ser	His	Leu	Asn	His	Val		
				785				790				795				800	
gtt	gat	ggt	ttg	att	cgt	cca	gaa	gaa	gtg	gca	gct	tgt	gtg	gat	gag	2448	
Val	Asp	Gly	Leu	Ile	Arg	Pro	Glu	Glu	Val	Ala	Ala	Cys	Val	Asp	Glu		
				805				810				815					
cta	agg	aaa	aaa	ctg	aag	tca	gga	gct	ggg	gaa	atg	aga	atc	cat	act	2496	
Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	Met	Arg	Ile	His	Thr		
				820				825				830					
cct	tca	gat	gtc	tta	ggg	aaa	agt	ctt	gct	gac	ttg	cag	aag	caa	ttc	2544	
Pro	Ser	Asp	Val	Leu	Gly	Lys	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	Phe		
				835				840				845					
agt	gag	atc	ctg	gca	cgc	tcc	cag	tgg	gaa	aga	cag	gaa	gca	caa	gtg	2592	
Ser	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Ser	Gln	Trp	Glu	Arg	Gln	Glu	Ala	Gln	Val		
				850				855				860					
aga	gag	aga	aaa	ctc	cag	gag	gaa	atg	gct	ctg	caa	caa	gag	aaa	ctg	2640	
Arg	Glu	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Glu	Met	Ala	Leu	Gln	Gln	Glu	Lys	Leu		
				865				870				875				880	
gcg	agc	gga	caa	gag	gag	ttc	agg	cac	gcc	tgc	gag	agg	gcc	ctg	gaa	2688	
Ala	Ser	Gly	Gln	Glu	Glu	Phe	Arg	His	Ala	Cys	Glu	Arg	Ala	Leu	Glu		
				885				890				895					
gcc	cga	att	agt	ttt	gat	aag	agg	cag	cac	gaa	gca	aga	atc	cag	cag	2736	
Ala	Arg	Ile	Ser	Phe	Asp	Lys	Arg	Gln	His	Glu	Ala	Arg	Ile	Gln	Gln		
				900				905				910					
ttg	gag	aat	gaa	att	cac	tat	ttg	caa	gaa	aat	cta	aaa	agt	atg	gag	2784	
Leu	Glu	Asn	Glu	Ile	His	Tyr	Leu	Gln	Glu	Asn	Leu	Lys	Ser	Met	Glu		
				915				920				925					
gaa	atc	caa	ggt	ctc	aca	gac	ctc	caa	ctt	cag	gaa	gct	gat	gaa	gag	2832	
Glu	Ile	Gln	Gly	Leu	Thr	Asp	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ala	Asp	Glu	Glu		
				930				935				940					
aag	gag	aga	att	ctg	gcc	caa	ctc	cgg	gag	tta	gag	aaa	aag	aag	aaa	2880	
Lys	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys		
				945				950				955				960	
ctt	gag	gat	gcc	aag	tct	cag	gag	cag	ttt	ctt	gga	tta	gat	aga	gaa	2928	
Leu	Glu	Asp	Ala	Lys	Ser	Gln	Glu	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu		
				965				970				975					
ttg	aag	aag	cta	aag	aaa	gct	gtg	gct	gcc	tct	gat	aag	ctg	gcc	aca	2976	
Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys	Ala	Val	Ala	Ala	Ser	Asp	Lys	Leu	Ala	Thr		
				980				985				990					

ES 2 605 646 T3

gct gag ctc acc att gcc aaa gac cag ctc aag tcc ctt cat gga act 3024  
Ala Glu Leu Thr Ile Ala Lys Asp Gln Leu Lys Ser Leu His Gly Thr  
995 1000 1005

gtg atg aaa att aac cag gag cga gca gag gag ctg cag gag acg 3069  
Val Met Lys Ile Asn Gln Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gln Glu Thr  
1010 1015 1020

gag agg ttc agc aga aag gca gca caa gca gct agg gat ctg atc 3114  
Glu Arg Phe Ser Arg Lys Ala Ala Gln Ala Ala Arg Asp Leu Ile  
1025 1030 1035

cga gca gaa gcg gag att gaa ctc ctg cag aag ctt ctc aga gat 3159  
Arg Ala Glu Ala Glu Ile Glu Leu Leu Gln Lys Leu Leu Arg Asp  
1040 1045 1050

aaa gag gag cag ttt cga aat gag att gag aaa gta gat gtc ggc 3204  
Lys Glu Glu Gln Phe Arg Asn Glu Ile Glu Lys Val Asp Val Gly  
1055 1060 1065

tct gga gga gca aag tca cag atg ctg gag atg gag aaa cta aat 3249  
Ser Gly Gly Ala Lys Ser Gln Met Leu Glu Met Glu Lys Leu Asn  
1070 1075 1080

gag aca atg gag agg caa aga aca gag att gct agg ctg agg aat 3294  
Glu Thr Met Glu Arg Gln Arg Thr Glu Ile Ala Arg Leu Arg Asn  
1085 1090 1095

tta cta gac ctc acc ggg gct gat aac aaa gga aac ttt gaa aat 3339  
Leu Leu Asp Leu Thr Gly Ala Asp Asn Lys Gly Asn Phe Glu Asn  
1100 1105 1110

gtt ttg gaa gaa att gct gaa ctt cga cgt gaa gtt tct cat cag 3384  
Val Leu Glu Glu Ile Ala Glu Leu Arg Arg Glu Val Ser His Gln  
1115 1120 1125

aat gat tac atc agc agc atg aca gat cct ttc aaa aga cga ggc 3429  
Asn Asp Tyr Ile Ser Ser Met Thr Asp Pro Phe Lys Arg Arg Gly  
1130 1135 1140

tat tgg tac ttt atg cca cca cca tca tca tca aaa gtt tcc agc 3474  
Tyr Trp Tyr Phe Met Pro Pro Pro Ser Ser Ser Lys Val Ser Ser  
1145 1150 1155

cac agt tcc cag gcc acc aag gac tct ggt gtt ggc cta aag tac 3519  
His Ser Ser Gln Ala Thr Lys Asp Ser Gly Val Gly Leu Lys Tyr  
1160 1165 1170

aca gcc tcc act ccg gtt aga aaa cca cat cgt gga cgg cag gat 3564  
Thr Ala Ser Thr Pro Val Arg Lys Pro His Arg Gly Arg Gln Asp  
1175 1180 1185

gga aag gag aac agt ggg cct cca cct gcc tca gga tac tgg gtg 3609  
Gly Lys Glu Asn Ser Gly Pro Pro Pro Ala Ser Gly Tyr Trp Val  
1190 1195 1200

tat tct cct atc agg agt ggg tta cat aaa tcg ttc tca aat aga 3654  
Tyr Ser Pro Ile Arg Ser Gly Leu His Lys Ser Phe Ser Asn Arg  
1205 1210 1215

ES 2 605 646 T3

gac gca	gac agt	gga gga	gat	agc cag	gaa gag	agc	gag cta	gat	3699
Asp Ala	Asp Ser	Gly Gly	Asp	Ser Gln	Glu Glu	Ser	Glu Leu	Asp	
1220			1225			1230			
gac caa	gaa gac	cac cca	ttt	gta cct	cct cct	gga	tac atg	atg	3744
Asp Gln	Glu Asp	His Pro	Phe	Val Pro	Pro Pro	Gly	Tyr Met	Met	
1235			1240			1245			
tac act	gtg ttt	cct gat	ggt	tct cct	gta ccc	cag	ggc atg	gcc	3789
Tyr Thr	Val Phe	Pro Asp	Gly	Ser Pro	Val Pro	Gln	Gly Met	Ala	
1250			1255			1260			
ctg tat	gca ccc	cct cct	ccc	ttg ccc	aac aat	agc	cag cct	ctt	3834
Leu Tyr	Ala Pro	Pro Pro	Pro	Leu Pro	Asn Asn	Ser	Gln Pro	Leu	
1265			1270			1275			
gac ctt	ggc act	gtt gtt	tat	ggc cca	cct cct	gtt	ggg gct	ccc	3879
Asp Leu	Gly Thr	Val Val	Tyr	Gly Pro	Pro Pro	Val	Gly Ala	Pro	
1280			1285			1290			
atc gtg	tat ggg	cct cca	cct	ccc aac	ttc tcc	gta	ccc ctc	atc	3924
Ile Val	Tyr Gly	Pro Pro	Pro	Pro Asn	Phe Ser	Val	Pro Leu	Ile	
1295			1300			1305			
ccc gtg	ggt gtg	ctg cac	tgc	aat gtc	cca gaa	cac	cat aac	ttg	3969
Pro Val	Gly Val	Leu His	Cys	Asn Val	Pro Glu	His	His Asn	Leu	
1310			1315			1320			
gag aat	gaa gtt	tct aga	tta	gaa gac	ata atg	cag	cat tta	aaa	4014
Glu Asn	Glu Val	Ser Arg	Leu	Glu Asp	Ile Met	Gln	His Leu	Lys	
1325			1330			1335			
tct ggg	aaa cgg	gaa cag	tgc	atg aaa	aca ccc	aag	ctg cag	tgc	4059
Ser Gly	Lys Arg	Glu Gln	Cys	Met Lys	Thr Pro	Lys	Leu Gln	Ser	
1340			1345			1350			
gag aaa	gaa ctc	gca gag	ctg	cag cat	aac att	gat	ggt ctt	ttg	4104
Glu Lys	Glu Leu	Ala Glu	Leu	Gln His	Asn Ile	Asp	Gly Leu	Leu	
1355			1360			1365			
caa gag	aag aaa	gac tta	gag	cat gaa	gta gaa	gaa	tta cat	aga	4149
Gln Glu	Lys Lys	Asp Leu	Glu	His Glu	Val Glu	Glu	Leu His	Arg	
1370			1375			1380			
acc atc	caa aaa	cat caa	cag	cga aaa	gat ttc	att	gat gga	aac	4194
Thr Ile	Gln Lys	His Gln	Gln	Arg Lys	Asp Phe	Ile	Asp Gly	Asn	
1385			1390			1395			
gtt gag	agt ctt	gtg aat	gat	cta gaa	ata gag	aag	tca ctc	aaa	4239
Val Glu	Ser Leu	Val Asn	Asp	Leu Glu	Ile Glu	Lys	Ser Leu	Lys	
1400			1405			1410			
cac cat	gaa gat	att gtt	gat	gaa att	gaa tgt	att	gag agg	acc	4284
His His	Glu Asp	Ile Val	Asp	Glu Ile	Glu Cys	Ile	Glu Arg	Thr	
1415			1420			1425			
ctt ctg	aag cgc	cgt gca	gag	ctc agg	gaa gcc	gac	cgg ctg	ctg	4329
Leu Leu	Lys Arg	Arg Ala	Glu	Leu Arg	Glu Ala	Asp	Arg Leu	Leu	
1430			1435			1440			
acg gag	gct gaa	agt gaa	ctt	tca tgc	acg aaa	gag	aaa aca	aaa	4374

ES 2 605 646 T3

Thr	Glu	Ala	Glu	Ser	Glu	Leu	Ser	Cys	Thr	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys			
	1445					1450					1455						
cat	gct	ggt	gag	aag	ttc	act	gat	gcc	aag	aga	aat	tta	ttg	caa			4419
His	Ala	Val	Glu	Lys	Phe	Thr	Asp	Ala	Lys	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln			
	1460					1465					1470						
act	gag	aaa	gat	gct	gag	gag	tta	gaa	agg	aga	gcc	cag	gaa	act			4464
Thr	Glu	Lys	Asp	Ala	Glu	Glu	Leu	Glu	Arg	Arg	Ala	Gln	Glu	Thr			
	1475					1480					1485						
gcc	att	aac	ctc	gtc	aaa	gcc	gac	cag	cag	ctg	aga	ttg	ctc	cag			4509
Ala	Ile	Asn	Leu	Val	Lys	Ala	Asp	Gln	Gln	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln			
	1490					1495					1500						
gct	gac	acg	aag	gat	ttg	gag	cag	cac	aaa	atg	gag	caa	gag	gaa			4554
Ala	Asp	Thr	Lys	Asp	Leu	Glu	Gln	His	Lys	Met	Glu	Gln	Glu	Glu			
	1505					1510					1515						
atc	ttg	aaa	gaa	ata	aac	aaa	gtt	gtt	gca	gca	aaa	gac	tca	gac			4599
Ile	Leu	Lys	Glu	Ile	Asn	Lys	Val	Val	Ala	Ala	Lys	Asp	Ser	Asp			
	1520					1525					1530						
ttc	cag	agc	cta	aac	aag	aag	aag	gaa	gta	ctg	aca	gga	gag	ctg			4644
Phe	Gln	Ser	Leu	Asn	Lys	Lys	Lys	Glu	Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Leu			
	1535					1540					1545						
cag	aaa	ctc	cag	aag	gac	att	gag	act	gca	cgg	cac	aat	gag	gat			4689
Gln	Lys	Leu	Gln	Lys	Asp	Ile	Glu	Thr	Ala	Arg	His	Asn	Glu	Asp			
	1550					1555					1560						
cag	cac	ctg	cag	gtc	ctt	aaa	gag	tcg	gag	acc	ctc	ctg	cag	gcc			4734
Gln	His	Leu	Gln	Val	Leu	Lys	Glu	Ser	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala			
	1565					1570					1575						
aag	aaa	gct	gag	ctg	gaa	aat	ctg	aaa	agc	cag	gtg	tca	gga	cag			4779
Lys	Lys	Ala	Glu	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Ser	Gln	Val	Ser	Gly	Gln			
	1580					1585					1590						
cag	cag	gag	atg	gcc	gtc	ttg	gac	agg	gag	tta	gga	cac	aag	aag			4824
Gln	Gln	Glu	Met	Ala	Val	Leu	Asp	Arg	Glu	Leu	Gly	His	Lys	Lys			
	1595					1600					1605						
gaa	gag	ctg	cat	ctc	ctc	cag	gaa	agc	atg	gtc	cag	gcc	aaa	gct			4869
Glu	Glu	Leu	His	Leu	Leu	Gln	Glu	Ser	Met	Val	Gln	Ala	Lys	Ala			
	1610					1615					1620						
gac	ctc	cag	gaa	gca	ctg	aga	cta	gga	gaa	agc	gaa	gta	act	gag			4914
Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Gly	Glu	Ser	Glu	Val	Thr	Glu			
	1625					1630					1635						
aag	tgc	aat	cac	att	agg	gaa	gta	aaa	tct	ctt	ctg	gaa	gaa	ctc			4959
Lys	Cys	Asn	His	Ile	Arg	Glu	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Glu	Glu	Leu			
	1640					1645					1650						
agt	ttt	cag	aaa	gga	gaa	ctg	aat	gtc	cag	atc	agt	gaa	aaa	aaa			5004
Ser	Phe	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asn	Val	Gln	Ile	Ser	Glu	Lys	Lys			
	1655					1660					1665						
act	caa	ctt	gca	ctc	ata	aag	cag	gaa	att	gaa	aaa	gag	gaa	gac			5049
Thr	Gln	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Gln	Glu	Ile	Glu	Lys	Glu	Glu	Asp			

ES 2 605 646 T3

1670		1675		1680	
aat ctt cag gta gtt tta ggg	caa atg tct aaa cat	aaa act gaa	5094		
Asn Leu Gln Val Val Leu Gly	Gln Met Ser Lys His	Lys Thr Glu			
1685		1690		1695	
cta aag aat att ctg gac atg	ttg caa ctt gaa aat	aat gag ctg	5139		
Leu Lys Asn Ile Leu Asp Met	Leu Gln Leu Glu Asn	Asn Glu Leu			
1700		1705		1710	
caa ggt ttg aag ctc caa cat	gac caa aag atg tct	gaa tta gag	5184		
Gln Gly Leu Lys Leu Gln His	Asp Gln Lys Met Ser	Glu Leu Glu			
1715		1720		1725	
aag act cgg gtt gaa gtg ctg	gag gag aaa ctg gag	tta gag agt	5229		
Lys Thr Arg Val Glu Val Leu	Glu Glu Lys Leu Glu	Leu Glu Ser			
1730		1735		1740	
ctg cag cag gca gcc ctg cga	cag aga ggg gag ata	gag tgg cag	5274		
Leu Gln Gln Ala Ala Leu Arg	Gln Arg Gly Glu Ile	Glu Trp Gln			
1745		1750		1755	
aag cag ctc ctc cag agg aac	aca cag gaa gta gag	cgg atg act	5319		
Lys Gln Leu Leu Gln Arg Asn	Thr Gln Glu Val Glu	Arg Met Thr			
1760		1765		1770	
gct gag acc cga gca tta cag	tcg tgt gtt gag tct	ttg tgc aaa	5364		
Ala Glu Thr Arg Ala Leu Gln	Ser Cys Val Glu Ser	Leu Cys Lys			
1775		1780		1785	
gaa aag caa gat ctc gaa gaa	aaa cag gac agc tgg	gaa aag aag	5409		
Glu Lys Gln Asp Leu Glu Glu	Lys Gln Asp Ser Trp	Glu Lys Lys			
1790		1795		1800	
ttg gca cag acc aaa cgg gtt	cta gca gct gca gaa	gag gac agc	5454		
Leu Ala Gln Thr Lys Arg Val	Leu Ala Ala Ala Glu	Glu Asp Ser			
1805		1810		1815	
gag atg gag cgg gca cgc tta	gaa aag ttg gaa ctg	gac gcc agg	5499		
Glu Met Glu Arg Ala Arg Leu	Glu Lys Leu Glu Leu	Asp Ala Arg			
1820		1825		1830	
aag ctg cag cag gag ttg gac	caa cga aac agg gag	aag ctc tcc	5544		
Lys Leu Gln Gln Glu Leu Asp	Gln Arg Asn Arg Glu	Lys Leu Ser			
1835		1840		1845	
ctg cat caa gac ctg gca gtg	gtg cag cag cag cta	caa gaa aaa	5589		
Leu His Gln Asp Leu Ala Val	Val Gln Gln Gln Leu	Gln Glu Lys			
1850		1855		1860	
cag gaa gca gta aac tca tta	cag aag gaa cta act	gat gtc cag	5634		
Gln Glu Ala Val Asn Ser Leu	Gln Lys Glu Leu Thr	Asp Val Gln			
1865		1870		1875	
gag cat ttg gac cta gca gaa	cag gag gtg ctc tgc	acc acc aag	5679		
Glu His Leu Asp Leu Ala Glu	Gln Glu Val Leu Cys	Thr Thr Lys			
1880		1885		1890	
cgc aag gac gca ctg ctc agc	gaa cag acc agg ctc	gag aag gac	5724		
Arg Lys Asp Ala Leu Leu Ser	Glu Gln Thr Arg Leu	Glu Lys Asp			
1895		1900		1905	

ES 2 605 646 T3

gtg ggt gaa tgg acg aag aag ttt gaa gac tgc cag aaa gaa ggg	5769
Val Gly Glu Trp Thr Lys Lys Phe Glu Asp Cys Gln Lys Glu Gly	
1910 1915 1920	
gag aca aag cag caa cag ctt caa ggg ctt cag aag gag att gaa	5814
Glu Thr Lys Gln Gln Gln Leu Gln Gly Leu Gln Lys Glu Ile Glu	
1925 1930 1935	
gga aac gag gcg aag cta gcc caa caa gaa atg atg ttt cag aga	5859
Gly Asn Glu Ala Lys Leu Ala Gln Gln Glu Met Met Phe Gln Arg	
1940 1945 1950	
ctc cag aaa gag cga gaa tgt gaa gaa aaa aag tta gaa gct agt	5904
Leu Gln Lys Glu Arg Glu Cys Glu Glu Lys Lys Leu Glu Ala Ser	
1955 1960 1965	
aaa gtg act ctg aag gag cag cag caa cag ctg gaa aag gaa ttg	5949
Lys Val Thr Leu Lys Glu Gln Gln Gln Glu Glu Lys Glu Leu	
1970 1975 1980	
atg gag cag aaa gcc aag ctg gac cag gtg ctc gct aag ctc ttg	5994
Met Glu Gln Lys Gly Lys Leu Asp Gln Val Leu Ala Lys Leu Leu	
1985 1990 1995	
gtg gct gag gag cgt gtc agg acc ttg cag gag gag gga agg tgg	6039
Val Ala Glu Glu Arg Val Arg Thr Leu Gln Glu Glu Gly Arg Trp	
2000 2005 2010	
agc gag acc ctg gag aag acg ctc tcc cag acc aag cga cag ctt	6084
Ser Glu Thr Leu Glu Lys Thr Leu Ser Gln Thr Lys Arg Gln Leu	
2015 2020 2025	
tca gaa cgg gag cag cag tta ctg gcc aag tca gac gag ctg ctg	6129
Ser Glu Arg Glu Gln Gln Leu Leu Ala Lys Ser Asp Glu Leu Leu	
2030 2035 2040	
gcc ctg cag aag gag acg gac tcc atg agg gcg gac ttc agc ctc	6174
Ala Leu Gln Lys Glu Thr Asp Ser Met Arg Ala Asp Phe Ser Leu	
2045 2050 2055	
ttg cgc aac cag ttc ctg aca gaa aga aag aaa gcc gag aag cag	6219
Leu Arg Asn Gln Phe Leu Thr Glu Arg Lys Lys Ala Glu Lys Gln	
2060 2065 2070	
gtg gcc agc ctg aag gaa gcc ctt aag atc cag cgg agc caa ctg	6264
Val Ala Ser Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Gln Arg Ser Gln Leu	
2075 2080 2085	
gag aag aac ctt ctg gag caa aag cag gag aac agc tgc atg cag	6309
Glu Lys Asn Leu Leu Glu Gln Lys Gln Glu Asn Ser Cys Met Gln	
2090 2095 2100	
agg gag atg gca acc atc gaa cag gtg gcc cag gac aac cac gag	6354
Arg Glu Met Ala Thr Ile Glu Gln Val Ala Gln Asp Asn His Glu	
2105 2110 2115	
cgg gcc cgg cgc cta atg agg gag ctc aac cag atg cag cgc gag	6399
Arg Ala Arg Arg Leu Met Arg Glu Leu Asn Gln Met Gln Arg Glu	
2120 2125 2130	

ES 2 605 646 T3

tac gtg gag ctc agg aaa cag atg aca aac caa aag gat ttg gaa	6444
Tyr Val Glu Leu Arg Lys Gln Met Thr Asn Gln Lys Asp Leu Glu	
2135 2140 2145	
aga aga cag atg gaa atc agt gat gcg atg caa gca ctt aaa tgt	6489
Arg Arg Gln Met Glu Ile Ser Asp Ala Met Gln Ala Leu Lys Cys	
2150 2155 2160	
gag gtg aaa gat gaa atc cga acc agc ctg aag aat ctc aac cag	6534
Glu Val Lys Asp Glu Ile Arg Thr Ser Leu Lys Asn Leu Asn Gln	
2165 2170 2175	
ttt ctt cca gaa ctg cca gcg gac ctg gag gcc ctt ctg gaa agg	6579
Phe Leu Pro Glu Leu Pro Ala Asp Leu Glu Ala Leu Leu Glu Arg	
2180 2185 2190	
aat gag aac ctt gga gga gcc ttg gag agc ttg aaa gag aat ttc	6624
Asn Glu Asn Leu Gly Gly Gly Leu Glu Ser Leu Lys Glu Asn Phe	
2195 2200 2205	
cgg ttt acc gtg agc gac aga cca tca tct tgc gaa gag aaa ctg	6669
Pro Phe Thr Val Ser Asp Arg Pro Ser Ser Cys Glu Glu Lys Leu	
2210 2215 2220	
aat ttt gcc cag gct cac gtg gcg gat gaa cag tgg cgg gga gag	6714
Asn Phe Gly Gln Ala His Val Ala Asp Glu Gln Trp Arg Gly Glu	
2225 2230 2235	
gca ctc cgg gag aag ctg cgc cac cgc gag gac cgg ctc aag gcc	6759
Ala Leu Arg Glu Lys Leu Arg His Arg Glu Asp Arg Leu Lys Ala	
2240 2245 2250	
cag ctg cgc cgc tgc atg tcc aag cag gcc gag gtg ctg agc gag	6804
Gln Leu Arg Arg Cys Met Ser Lys Gln Ala Glu Val Leu Ser Glu	
2255 2260 2265	
ggc cgg cgg cgc acg gag ggg acc ctg cac agc ctg cgg cgg cag	6849
Gly Arg Arg Arg Thr Glu Gly Thr Leu His Ser Leu Arg Arg Gln	
2270 2275 2280	
gtg gac gcc ctg ggc gag ctg gtc acc agc act tcc ggg gac tcc	6894
Val Asp Ala Leu Gly Glu Leu Val Thr Ser Thr Ser Gly Asp Ser	
2285 2290 2295	
gcg tcc acc cgc agt ctg tcg cgc acc gag gcc tcg ctc gcc gag	6939
Ala Ser Thr Arg Ser Leu Ser Arg Thr Glu Gly Ser Leu Ala Glu	
2300 2305 2310	
gac gaa ccg ccg ggg ccc agc cag agc tcc cgg cgg ctc ccc cga	6984
Asp Glu Pro Pro Gly Pro Ser Gln Ser Ser Arg Arg Leu Pro Arg	
2315 2320 2325	
ggc ccg tcg ccg cgg ctg gac gcg cac cga ccc tga ggaccggag	7030
Gly Pro Ser Pro Arg Leu Asp Ala His Arg Pro	
2330 2335	
gaccgggagg ccggggtcc cctcggaacg cttcctccgc gtcggcggac accaggctca	7090
cggaagggcg cgtccatgcg ggaagagccg cgagcggaac ccggatgccc gggetggtct	7150
ctgggccttg gaaacgtggt gccgtaaaag cagcgcgccgc ggctgctggac ttgaagcccc	7210

ES 2 605 646 T3

gaactggtaa actcggcggc tgccggggcga actgtactca ggactttttt cacggacacc 7270  
 gtcagatttt atttttggaa atctattttc atatgaaaat aaaagataaa agcgcctgaa 7330  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaact agt 7353

5 <210> 26  
 <211> 2339  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*  
 <400> 26

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

10

ES 2 605 646 T3

Lys Ser Leu Arg Ile Leu Asn Leu Lys Gly Asn Lys Ile Ser Ser Leu  
 195 200 205  
 Gln Asp Val Ser Lys Leu Lys Pro Leu Gln Asp Leu Thr Ser Leu Ile  
 210 215 220  
 Leu Leu Glu Asn Pro Val Ala Thr Leu Pro His Tyr Ile Gln Phe Thr  
 225 230 235 240  
 Ile Phe His Leu Arg Ser Leu Glu Ser Leu Glu Gly Gln Pro Val Thr  
 245 250 255  
 Ser Gln Asp Arg Gln Glu Ala Phe Ala Arg Phe Ser Leu Asp Glu Val  
 260 265 270  
 Glu Arg Leu Glu Arg Asp Leu Glu Lys Lys Thr Met Glu Thr Glu Glu  
 275 280 285  
 Leu Arg Ser Glu Gln Thr Arg Phe Leu Glu Glu Ile Lys Ser Gln Asp  
 290 295 300  
 Lys Leu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Glu Ala Arg Leu Gln Lys Gln Ser  
 305 310 315 320  
 Tyr Glu Glu Leu Glu Ser Asn Leu Asn Thr Lys Asn Glu Leu Leu Lys  
 325 330 335  
 Gln Lys Thr Met Glu Leu Met Arg Ala Cys Gln Lys Gln Tyr Glu Met  
 340 345 350  
 Glu Gln Glu Leu Ala Phe Tyr Lys Ile Asp Ala Lys Phe Glu Pro Leu  
 355 360 365  
 Asn Tyr Tyr Pro Ser Glu Tyr Val Glu Ile Asp Lys Thr Pro Asp Glu  
 370 375 380  
 Ser Pro Tyr Ile Gly Lys Ser Arg Tyr Lys Arg Asn Met Phe Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Glu Ser Tyr Ile Ile Ala Asn Ala Gln Thr Val Lys Ile Lys Lys Met  
 405 410 415  
 Glu Leu Asp Glu Gly Glu Gln Leu Arg Asn Glu His Val Asn Leu Gly  
 420 425 430

ES 2 605 646 T3

Ala Ser Pro Thr Asp Ile Gln Leu Glu Asp Lys Glu Lys Lys Ile Ser  
 435 440 445

Ala Ala Gln Thr Arg Leu Ser Glu Leu His Asp Glu Ile Glu Lys Ala  
 450 455 460

Glu Gln Gln Ile Leu Arg Ala Thr Glu Glu Phe Lys Gln Leu Glu Glu  
 465 470 475 480

Ala Ile Gln Leu Lys Lys Ile Ser Glu Ala Glu Lys Asp Leu Leu Phe  
 485 490 495

Lys Gln Leu Ser Gly Arg Ile Gln Leu Leu Asn Lys Leu Arg Gln Glu  
 500 505 510

Ala Val Asp Leu Glu Thr Gln Met Glu Lys Gln Arg Gln Glu Ile Gly  
 515 520 525

Glu Lys Gln Asn Glu Ile Lys Asp Leu Glu Ile Val Thr Asp Ser Leu  
 530 535 540

Asp Ser Arg Asp Pro Lys His Cys His Met Lys Ala Gln Lys Arg Gly  
 545 550 555 560

Lys Glu Gln Gln Leu Asp Ile Met Asn Lys Gln Tyr Lys Gln Leu Glu  
 565 570 575

Ser Arg Leu Asp Glu Ile Leu Ser Arg Ile Ala Lys Glu Thr Glu Glu  
 580 585 590

Ile Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Thr Glu Gly Gln Ile Ala Ala Asn  
 595 600 605

Glu Ala Leu Lys Lys Asp Leu Glu Ser Val Ile Ser Gly Leu Gln Glu  
 610 615 620

Tyr Leu Glu Thr Val Lys Gly Gln Ala Arg Gln Ala Gln Asn Glu Cys  
 625 630 635 640

Arg Lys Leu Gln Asp Glu Lys Glu Thr Leu Leu Gln Arg Leu Ser Glu  
 645 650 655

Val Glu Gln Glu Arg Asp Gln Leu Glu Ile Val Ala Ile Asp Ala Glu  
 660 665 670

ES 2 605 646 T3

Asn Met Arg Lys Glu Leu Ala Glu Leu Glu Asn Ala Leu Gln Glu Gln  
 675 680 685  
 His Glu Val Asn Ile Ser Leu Gln Gln Thr Gln Gly Asp Leu Ser Ala  
 690 695 700  
 Tyr Glu Ala Glu Leu Glu Ala Gln Leu Lys Ile Arg Asp Ala Glu Ala  
 705 710 715 720  
 Asn Gln Leu Lys Glu Glu Leu Glu Lys Leu Arg Arg Leu Ser Gln Leu  
 725 730 735  
 Glu Gln Ser Ala Leu Gln Ala Glu Leu Glu Lys Glu Lys Gln Ala Phe  
 740 745 750  
 Lys Thr Ala Val Lys Lys Ala Gln Leu Ser Glu Gly Lys Asp Gln Glu  
 755 760 765  
 Asn Ser Glu Leu Arg Thr Gln Leu Gln Gln Leu Gln Asp Asp Asn Asp  
 770 775 780  
 Leu Leu Lys Gln Gln Leu Lys Asp Phe Gln Ser His Leu Asn His Val  
 785 790 795 800  
 Val Asp Gly Leu Ile Arg Pro Glu Glu Val Ala Ala Cys Val Asp Glu  
 805 810 815  
 Leu Arg Lys Lys Leu Lys Ser Gly Ala Gly Glu Met Arg Ile His Thr  
 820 825 830  
 Pro Ser Asp Val Leu Gly Lys Ser Leu Ala Asp Leu Gln Lys Gln Phe  
 835 840 845  
 Ser Glu Ile Leu Ala Arg Ser Gln Trp Glu Arg Gln Glu Ala Gln Val  
 850 855 860  
 Arg Glu Arg Lys Leu Gln Glu Glu Met Ala Leu Gln Gln Glu Lys Leu  
 865 870 875 880  
 Ala Ser Gly Gln Glu Glu Phe Arg His Ala Cys Glu Arg Ala Leu Glu  
 885 890 895  
 Ala Arg Ile Ser Phe Asp Lys Arg Gln His Glu Ala Arg Ile Gln Gln  
 900 905 910  
 Leu Glu Asn Glu Ile His Tyr Leu Gln Glu Asn Leu Lys Ser Met Glu

ES 2 605 646 T3

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

ES 2 605 646 T3

His Ser Ser Gln Ala Thr Lys Asp Ser Gly Val Gly Leu Lys Tyr  
1160 1165 1170

Thr Ala Ser Thr Pro Val Arg Lys Pro His Arg Gly Arg Gln Asp  
1175 1180 1185

Gly Lys Glu Asn Ser Gly Pro Pro Pro Ala Ser Gly Tyr Trp Val  
1190 1195 1200

Tyr Ser Pro Ile Arg Ser Gly Leu His Lys Ser Phe Ser Asn Arg  
1205 1210 1215

Asp Ala Asp Ser Gly Gly Asp Ser Gln Glu Glu Ser Glu Leu Asp  
1220 1225 1230

Asp Gln Glu Asp His Pro Phe Val Pro Pro Pro Gly Tyr Met Met  
1235 1240 1245

Tyr Thr Val Phe Pro Asp Gly Ser Pro Val Pro Gln Gly Met Ala  
1250 1255 1260

Leu Tyr Ala Pro Pro Pro Pro Leu Pro Asn Asn Ser Gln Pro Leu  
1265 1270 1275

Asp Leu Gly Thr Val Val Tyr Gly Pro Pro Pro Val Gly Ala Pro  
1280 1285 1290

Ile Val Tyr Gly Pro Pro Pro Pro Asn Phe Ser Val Pro Leu Ile  
1295 1300 1305

Pro Val Gly Val Leu His Cys Asn Val Pro Glu His His Asn Leu  
1310 1315 1320

Glu Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ile Met Gln His Leu Lys  
1325 1330 1335

Ser Gly Lys Arg Glu Gln Cys Met Lys Thr Pro Lys Leu Gln Ser  
1340 1345 1350

Glu Lys Glu Leu Ala Glu Leu Gln His Asn Ile Asp Gly Leu Leu  
1355 1360 1365

Gln Glu Lys Lys Asp Leu Glu His Glu Val Glu Glu Leu His Arg  
1370 1375 1380

ES 2 605 646 T3

Thr Ile Gln Lys His Gln Gln Arg Lys Asp Phe Ile Asp Gly Asn  
1385 1390 1395

Val Glu Ser Leu Val Asn Asp Leu Glu Ile Glu Lys Ser Leu Lys  
1400 1405 1410

His His Glu Asp Ile Val Asp Glu Ile Glu Cys Ile Glu Arg Thr  
1415 1420 1425

Leu Leu Lys Arg Arg Ala Glu Leu Arg Glu Ala Asp Arg Leu Leu  
1430 1435 1440

Thr Glu Ala Glu Ser Glu Leu Ser Cys Thr Lys Glu Lys Thr Lys  
1445 1450 1455

His Ala Val Glu Lys Phe Thr Asp Ala Lys Arg Asn Leu Leu Gln  
1460 1465 1470

Thr Glu Lys Asp Ala Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ala Gln Glu Thr  
1475 1480 1485

Ala Ile Asn Leu Val Lys Ala Asp Gln Gln Leu Arg Leu Leu Gln  
1490 1495 1500

Ala Asp Thr Lys Asp Leu Glu Gln His Lys Met Glu Gln Glu Glu  
1505 1510 1515

Ile Leu Lys Glu Ile Asn Lys Val Val Ala Ala Lys Asp Ser Asp  
1520 1525 1530

Phe Gln Ser Leu Asn Lys Lys Lys Glu Val Leu Thr Gly Glu Leu  
1535 1540 1545

Gln Lys Leu Gln Lys Asp Ile Glu Thr Ala Arg His Asn Glu Asp  
1550 1555 1560

Gln His Leu Gln Val Leu Lys Glu Ser Glu Thr Leu Leu Gln Ala  
1565 1570 1575

Lys Lys Ala Glu Leu Glu Asn Leu Lys Ser Gln Val Ser Gly Gln  
1580 1585 1590

Gln Gln Glu Met Ala Val Leu Asp Arg Glu Leu Gly His Lys Lys  
1595 1600 1605

ES 2 605 646 T3

Glu Glu Leu His Leu Leu Gln Glu Ser Met Val Gln Ala Lys Ala  
 1610 1615 1620

Asp Leu Gln Glu Ala Leu Arg Leu Gly Glu Ser Glu Val Thr Glu  
 1625 1630 1635

Lys Cys Asn His Ile Arg Glu Val Lys Ser Leu Leu Glu Glu Leu  
 1640 1645 1650

Ser Phe Gln Lys Gly Glu Leu Asn Val Gln Ile Ser Glu Lys Lys  
 1655 1660 1665

Thr Gln Leu Ala Leu Ile Lys Gln Glu Ile Glu Lys Glu Glu Asp  
 1670 1675 1680

Asn Leu Gln Val Val Leu Gly Gln Met Ser Lys His Lys Thr Glu  
 1685 1690 1695

Leu Lys Asn Ile Leu Asp Met Leu Gln Leu Glu Asn Asn Glu Leu  
 1700 1705 1710

Gln Gly Leu Lys Leu Gln His Asp Gln Lys Met Ser Glu Leu Glu  
 1715 1720 1725

Lys Thr Arg Val Glu Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Leu Glu Ser  
 1730 1735 1740

Leu Gln Gln Ala Ala Leu Arg Gln Arg Gly Glu Ile Glu Trp Gln  
 1745 1750 1755

Lys Gln Leu Leu Gln Arg Asn Thr Gln Glu Val Glu Arg Met Thr  
 1760 1765 1770

Ala Glu Thr Arg Ala Leu Gln Ser Cys Val Glu Ser Leu Cys Lys  
 1775 1780 1785

Glu Lys Gln Asp Leu Glu Glu Lys Gln Asp Ser Trp Glu Lys Lys  
 1790 1795 1800

Leu Ala Gln Thr Lys Arg Val Leu Ala Ala Ala Glu Glu Asp Ser  
 1805 1810 1815

Glu Met Glu Arg Ala Arg Leu Glu Lys Leu Glu Leu Asp Ala Arg  
 1820 1825 1830

Lys Leu Gln Gln Glu Leu Asp Gln Arg Asn Arg Glu Lys Leu Ser

ES 2 605 646 T3

1835						1840						1845							
Leu	His	Gln	Asp	Leu	Ala	Val	Val	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Glu	Lys					
1850						1855					1860								
Gln	Glu	Ala	Val	Asn	Ser	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Thr	Asp	Val	Gln					
1865						1870					1875								
Glu	His	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Val	Leu	Cys	Thr	Thr	Lys					
1880						1885					1890								
Arg	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu	Lys	Asp					
1895						1900					1905								
Val	Gly	Glu	Trp	Thr	Lys	Lys	Phe	Glu	Asp	Cys	Gln	Lys	Glu	Gly					
1910						1915					1920								
Glu	Thr	Lys	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Gly	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Glu					
1925						1930					1935								
Gly	Asn	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Gln	Gln	Glu	Met	Met	Phe	Gln	Arg					
1940						1945					1950								
Leu	Gln	Lys	Glu	Arg	Glu	Cys	Glu	Glu	Lys	Lys	Leu	Glu	Ala	Ser					
1955						1960					1965								
Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Gln	Gln	Gln	Gln	Leu	Glu	Lys	Glu	Leu					
1970						1975					1980								
Met	Glu	Gln	Lys	Gly	Lys	Leu	Asp	Gln	Val	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu					
1985						1990					1995								
Val	Ala	Glu	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Leu	Gln	Glu	Glu	Gly	Arg	Trp					
2000						2005					2010								
Ser	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Arg	Gln	Leu					
2015						2020					2025								
Ser	Glu	Arg	Glu	Gln	Gln	Leu	Leu	Ala	Lys	Ser	Asp	Glu	Leu	Leu					
2030						2035					2040								
Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Thr	Asp	Ser	Met	Arg	Ala	Asp	Phe	Ser	Leu					
2045						2050					2055								
Leu	Arg	Asn	Gln	Phe	Leu	Thr	Glu	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Gln					
2060						2065					2070								

ES 2 605 646 T3

Val Ala Ser Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Gln Arg Ser Gln Leu  
2075 2080 2085

Glu Lys Asn Leu Leu Glu Gln Lys Gln Glu Asn Ser Cys Met Gln  
2090 2095 2100

Arg Glu Met Ala Thr Ile Glu Gln Val Ala Gln Asp Asn His Glu  
2105 2110 2115

Arg Ala Arg Arg Leu Met Arg Glu Leu Asn Gln Met Gln Arg Glu  
2120 2125 2130

Tyr Val Glu Leu Arg Lys Gln Met Thr Asn Gln Lys Asp Leu Glu  
2135 2140 2145

Arg Arg Gln Met Glu Ile Ser Asp Ala Met Gln Ala Leu Lys Cys  
2150 2155 2160

Glu Val Lys Asp Glu Ile Arg Thr Ser Leu Lys Asn Leu Asn Gln  
2165 2170 2175

Phe Leu Pro Glu Leu Pro Ala Asp Leu Glu Ala Leu Leu Glu Arg  
2180 2185 2190

Asn Glu Asn Leu Gly Gly Gly Leu Glu Ser Leu Lys Glu Asn Phe  
2195 2200 2205

Pro Phe Thr Val Ser Asp Arg Pro Ser Ser Cys Glu Glu Lys Leu  
2210 2215 2220

Asn Phe Gly Gln Ala His Val Ala Asp Glu Gln Trp Arg Gly Glu  
2225 2230 2235

Ala Leu Arg Glu Lys Leu Arg His Arg Glu Asp Arg Leu Lys Ala  
2240 2245 2250

Gln Leu Arg Arg Cys Met Ser Lys Gln Ala Glu Val Leu Ser Glu  
2255 2260 2265

Gly Arg Arg Arg Thr Glu Gly Thr Leu His Ser Leu Arg Arg Gln  
2270 2275 2280

Val Asp Ala Leu Gly Glu Leu Val Thr Ser Thr Ser Gly Asp Ser  
2285 2290 2295

ES 2 605 646 T3

Ala Ser Thr Arg Ser Leu Ser Arg Thr Glu Gly Ser Leu Ala Glu  
2300 2305 2310

Asp Glu Pro Pro Gly Pro Ser Gln Ser Ser Arg Arg Leu Pro Arg  
2315 2320 2325

Gly Pro Ser Pro Arg Leu Asp Ala His Arg Pro  
2330 2335

5 <210> 27  
<211> 7431  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<221> CDS  
<222> (32)..(7009)  
<223>

<400> 27

ES 2 605 646 T3

gttttgatga acacctggct ttattcttgc a atg aag aaa ggt tct caa caa	52
Met Lys Lys Gly Ser Gln Gln	
1 5	
aaa ata ttc tcc aaa gca aag ata cca tca tca tct cac tct cct atc	100
Lys Ile Phe Ser Lys Ala Lys Ile Pro Ser Ser Ser His Ser Pro Ile	
10 15 20	
cca tca tct atg tcc aat atg aga tct agg tca ctt tca cct ttg att	148
Pro Ser Ser Met Ser Asn Met Arg Ser Arg Ser Leu Ser Pro Leu Ile	
25 30 35	
gga tca gag act cta cct ttt cat tct gga gga cag tgg tgt gag caa	196
Gly Ser Glu Thr Leu Pro Phe His Ser Gly Gly Gln Trp Cys Glu Gln	
40 45 50 55	
gtt gag att gca gat gaa aac aat atg ctt ttg gac tat caa gac cat	244
Val Glu Ile Ala Asp Glu Asn Asn Met Leu Leu Asp Tyr Gln Asp His	
60 65 70	
aaa gga gct gat tca cat gca gga gtt aga tat att aca gag gcc ctc	292
Lys Gly Ala Asp Ser His Ala Gly Val Arg Tyr Ile Thr Glu Ala Leu	
75 80 85	
att aaa aaa ctt act aaa cag gat aat ttg gct ttg ata aaa tct ctg	340
Ile Lys Lys Leu Thr Lys Gln Asp Asn Leu Ala Leu Ile Lys Ser Leu	
90 95 100	
aac ctt tca ctt tct aaa gac ggt ggc aag aaa ttt aag tat att gag	388
Asn Leu Ser Leu Ser Lys Asp Gly Gly Lys Lys Phe Lys Tyr Ile Glu	
105 110 115	
aat ttg gaa aaa tgt gtt aaa ctt gaa gta ctg aat ctc agc tat aat	436
Asn Leu Glu Lys Cys Val Lys Leu Glu Val Leu Asn Leu Ser Tyr Asn	
120 125 130 135	
cta ata ggg aag att gaa aag ttg gac aag ctg tta aaa tta cgt gaa	484

ES 2 605 646 T3

Leu	Ile	Gly	Lys	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Arg	Glu		
				140					145					150			
ctc	aac	tta	tca	tat	aac	aaa	atc	agc	aaa	att	gaa	ggc	ata	gaa	aat		532
Leu	Asn	Leu	Ser	Tyr	Asn	Lys	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Glu	Asn		
			155					160					165				
atg	tgt	aat	ctg	caa	aag	ctt	aac	ctt	gca	gga	aat	gaa	att	gag	cat		580
Met	Cys	Asn	Leu	Gln	Lys	Leu	Asn	Leu	Ala	Gly	Asn	Glu	Ile	Glu	His		
		170					175					180					
att	cca	gta	tgg	tta	ggg	aag	aag	tta	aaa	tct	ttg	cga	gtc	ctc	aat		628
Ile	Pro	Val	Trp	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu	Lys	Ser	Leu	Arg	Val	Leu	Asn		
	185					190					195						
ttg	aaa	ggc	aac	aag	ata	tca	tcg	ctc	caa	gat	ata	agc	aag	ttg	aaa		676
Leu	Lys	Gly	Asn	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys		
200				205						210					215		
ccg	ctt	caa	gat	ttg	att	tct	ctg	atc	cta	gtt	gaa	aat	cca	gtt	gtg		724
Pro	Leu	Gln	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Ile	Leu	Val	Glu	Asn	Pro	Val	Val		
			220					225						230			
acc	ctt	cct	cat	tac	ctc	cag	ttt	acc	att	ttc	cac	ctc	cgt	tca	ttg		772
Thr	Leu	Pro	His	Tyr	Leu	Gln	Phe	Thr	Ile	Phe	His	Leu	Arg	Ser	Leu		
			235					240					245				
gaa	agt	ttg	gaa	ggt	cag	cca	gta	acc	act	cag	gat	aga	cag	gag	gct		820
Glu	Ser	Leu	Glu	Gly	Gln	Pro	Val	Thr	Thr	Gln	Asp	Arg	Gln	Glu	Ala		
		250				255						260					
ttt	gag	aga	ttc	agt	tta	gaa	gag	gta	gaa	aga	ctg	gaa	aga	gac	cta		868
Phe	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Glu	Arg	Leu	Glu	Arg	Asp	Leu		
	265				270						275						
gaa	aaa	aag	atg	ata	gaa	act	gaa	gag	ctt	aag	agc	aaa	caa	aca	agg		916
Glu	Lys	Lys	Met	Ile	Glu	Thr	Glu	Glu	Leu	Lys	Ser	Lys	Gln	Thr	Arg		
280				285					290						295		
ttc	ctt	gag	gaa	att	aaa	aat	caa	gat	aaa	ttg	aat	aaa	tca	tta	aaa		964
Phe	Leu	Glu	Glu	Ile	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Leu	Asn	Lys	Ser	Leu	Lys		
				300					305					310			
gag	gag	gcc	atg	tta	cag	aaa	cag	agc	tgt	gag	gaa	ctc	aag	agt	gac		1012
Glu	Glu	Ala	Met	Leu	Gln	Lys	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Leu	Lys	Ser	Asp		
			315					320					325				
tta	aac	aca	aaa	aat	gaa	ttg	cta	aaa	cag	aag	acc	ata	gaa	tta	aca		1060
Leu	Asn	Thr	Lys	Asn	Glu	Leu	Leu	Lys	Gln	Lys	Thr	Ile	Glu	Leu	Thr		
		330					335					340					
cga	gca	tgt	cag	aag	caa	tat	gag	ctg	gaa	cag	gaa	ttg	gcc	ttt	tat		1108
Arg	Ala	Cys	Gln	Lys	Gln	Tyr	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Leu	Ala	Phe	Tyr		
	345					350					355						
aaa	att	gat	gct	aaa	ttt	gag	cca	cta	aat	tat	tat	cca	tca	gag	tat		1156
Lys	Ile	Asp	Ala	Lys	Phe	Glu	Pro	Leu	Asn	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Glu	Tyr		
360				365					370						375		
gct	gaa	att	gat	aaa	gcc	cca	gat	gaa	agc	cct	tac	att	ggc	aaa	tcc		1204
Ala	Glu	Ile	Asp	Lys	Ala	Pro	Asp	Glu	Ser	Pro	Tyr	Ile	Gly	Lys	Ser		

ES 2 605 646 T3

				380					385					390		
aga	tac	aag	aga	aat	atg	ttt	gcc	aca	gag	agt	tat	att	att	gac	agt	1252
Arg	Tyr	Lys	Arg	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser	Tyr	Ile	Ile	Asp	Ser	
			395					400					405			
gct	cag	gca	gta	cag	atc	aag	aag	atg	gag	cca	gat	gaa	caa	ctt	aga	1300
Ala	Gln	Ala	Val	Gln	Ile	Lys	Lys	Met	Glu	Pro	Asp	Glu	Gln	Leu	Arg	
		410					415					420				
aat	gat	cac	atg	aac	ttg	aga	ggc	cac	aca	cca	ctg	gac	acg	caa	ctg	1348
Asn	Asp	His	Met	Asn	Leu	Arg	Gly	His	Thr	Pro	Leu	Asp	Thr	Gln	Leu	
	425					430					435					
gaa	gac	aaa	gaa	aaa	aaa	ata	agt	gca	gca	caa	act	cga	cta	tca	gaa	1396
Glu	Asp	Lys	Glu	Lys	Lys	Ile	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Arg	Leu	Ser	Glu	
440					445					450					455	
ctg	cat	gat	gaa	ata	gaa	aag	gca	gaa	caa	caa	att	ttg	aga	gct	act	1444
Leu	His	Asp	Glu	Ile	Glu	Lys	Ala	Glu	Gln	Gln	Ile	Leu	Arg	Ala	Thr	
			460					465						470		
gaa	gaa	ttt	aaa	caa	ctg	gaa	gaa	gct	ata	caa	cta	aaa	aag	att	tca	1492
Glu	Glu	Phe	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Ala	Ile	Gln	Leu	Lys	Lys	Ile	Ser	
			475					480					485			
gaa	gca	ggg	aaa	gac	ctt	ctt	tac	aag	cag	ttg	agt	ggt	aga	cta	caa	1540
Glu	Ala	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Tyr	Lys	Gln	Leu	Ser	Gly	Arg	Leu	Gln	
		490					495					500				
ctt	gta	aat	aaa	tta	cgc	cag	gaa	gct	ctg	gat	cta	gaa	ctg	cag	atg	1588
Leu	Val	Asn	Lys	Leu	Arg	Gln	Glu	Ala	Leu	Asp	Leu	Glu	Leu	Gln	Met	
	505					510					515					
gaa	aag	caa	aag	cag	gaa	att	gcc	gga	aag	cag	aag	gag	att	aag	gac	1636
Glu	Lys	Gln	Lys	Gln	Glu	Ile	Ala	Gly	Lys	Gln	Lys	Glu	Ile	Lys	Asp	
520					525					530					535	
ctg	caa	ata	gcc	ata	gat	agc	ctg	gat	tcc	aaa	gac	cca	aaa	cat	tcc	1684
Leu	Gln	Ile	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Asp	Ser	Lys	Asp	Pro	Lys	His	Ser	
			540					545						550		
cat	atg	aag	gct	caa	aag	agc	ggt	aaa	gaa	caa	cag	ctt	gac	att	atg	1732
His	Met	Lys	Ala	Gln	Lys	Ser	Gly	Lys	Glu	Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Met	
			555					560					565			
aac	aag	cag	tac	caa	caa	ctt	gaa	agt	cgt	ttg	gat	gag	ata	ctt	tct	1780
Asn	Lys	Gln	Tyr	Gln	Gln	Leu	Glu	Ser	Arg	Leu	Asp	Glu	Ile	Leu	Ser	
		570					575					580				
aga	att	gct	aag	gaa	acg	gaa	gag	att	aag	gac	ctt	gaa	gaa	cag	ctt	1828
Arg	Ile	Ala	Lys	Glu	Thr	Glu	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	
	585					590					595					
act	gaa	ggc	cag	ata	gca	gca	aat	gaa	gcc	ctg	aag	aag	gat	tta	gaa	1876
Thr	Glu	Gly	Gln	Ile	Ala	Ala	Asn	Glu	Ala	Leu	Lys	Lys	Asp	Leu	Glu	
600					605					610					615	
ggt	gtt	atc	agt	ggg	ttg	caa	gaa	tac	ctg	ggg	acc	att	aaa	ggc	cag	1924
Gly	Val	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Glu	Tyr	Leu	Gly	Thr	Ile	Lys	Gly	Gln	
				620					625					630		

ES 2 605 646 T3

gca act cag gcc cag aat gag tgc agg aag ctg cgg gat gag aaa gag 1972  
Ala Thr Gln Ala Gln Asn Glu Cys Arg Lys Leu Arg Asp Glu Lys Glu  
635 640 645

aca ttg ttg cag aga ttg aca gaa gtc gag cag gag aga gac cag ctg 2020  
Thr Leu Leu Gln Arg Leu Thr Glu Val Glu Gln Glu Arg Asp Gln Leu  
650 655 660

gaa ata gtt gcc atg gat gca gaa aat atg agg aag gag ctt gca gag 2068  
Glu Ile Val Ala Met Asp Ala Glu Asn Met Arg Lys Glu Leu Ala Glu  
665 670 675

cta gaa agt gcc ctc caa gag cag cat gag gtg aat gca tct ttg cag 2116  
Leu Glu Ser Ala Leu Gln Glu Gln His Glu Val Asn Ala Ser Leu Gln  
680 685 690 695

cag acc cag gga gat ctc agt gcc tat gaa gct gag cta gag gct cgg 2164  
Gln Thr Gln Gly Asp Leu Ser Ala Tyr Glu Ala Glu Leu Glu Ala Arg  
700 705 710

cta aac cta agg gat gct gaa gcc aac cag ctc aag gaa gag ttg gaa 2212  
Leu Asn Leu Arg Asp Ala Glu Ala Asn Gln Leu Lys Glu Glu Leu Glu  
715 720 725

aaa gta aca aga ctt acc cag tta gaa caa tca gcc ctt caa gca gaa 2260  
Lys Val Thr Arg Leu Thr Gln Leu Glu Gln Ser Ala Leu Gln Ala Glu  
730 735 740

ctt gag aag gaa agg caa gcc ctc aag aat gcc ctt gga aaa gcc cag 2308  
Leu Glu Lys Glu Arg Gln Ala Leu Lys Asn Ala Leu Gly Lys Ala Gln  
745 750 755

ttc tca gaa gaa aag gag caa gag aac agt gag ctc cat gca aaa ctt 2356  
Phe Ser Glu Glu Lys Glu Gln Glu Asn Ser Glu Leu His Ala Lys Leu  
760 765 770 775

aaa cac ttg cag gat gac aat aat ctg tta aaa cag caa ctt aaa gat 2404  
Lys His Leu Gln Asp Asp Asn Asn Leu Leu Lys Gln Gln Leu Lys Asp  
780 785 790

ttc cag aat cac ctt aac cat gtg gtt gat ggt ttg gtt cgt cca gaa 2452  
Phe Gln Asn His Leu Asn His Val Val Asp Gly Leu Val Arg Pro Glu  
795 800 805

gaa gtg gca gct cgt gtg gat gag cta aga aga aaa ctg aaa tta gga 2500  
Glu Val Ala Ala Arg Val Asp Glu Leu Arg Arg Lys Leu Lys Leu Gly  
810 815 820

act ggg gaa atg aac atc cat agt cct tca gat gtc tta ggg aaa agt 2548  
Thr Gly Glu Met Asn Ile His Ser Pro Ser Asp Val Leu Gly Lys Ser  
825 830 835

ctt gct gat tta cag aaa caa ttc agt gaa att ctt gca cgc tcc aag 2596  
Leu Ala Asp Leu Gln Lys Gln Phe Ser Glu Ile Leu Ala Arg Ser Lys  
840 845 850 855

tgg gaa aga gat gaa gca caa gtt aga gag aga aaa ctc caa gaa gaa 2644  
Trp Glu Arg Asp Glu Ala Gln Val Arg Glu Arg Lys Leu Gln Glu Glu  
860 865 870

ES 2 605 646 T3

atg gct ctg cag caa gag aaa ctg gca act gga caa gaa gag ttc agg	2692
Met Ala Leu Gln Gln Glu Lys Leu Ala Thr Gly Gln Glu Glu Phe Arg	
875 880 885	
cag gcc tgt gag aga gcc ctg gaa gca aga atg aat ttt gat aag agg	2740
Gln Ala Cys Glu Arg Ala Leu Glu Ala Arg Met Asn Phe Asp Lys Arg	
890 895 900	
caa cat gaa gca aga atc cag caa atg gag aat gaa att cac tat ttg	2788
Gln His Glu Ala Arg Ile Gln Gln Met Glu Asn Glu Ile His Tyr Leu	
905 910 915	
caa gaa aat cta aaa agt atg gag gaa atc caa ggc ctt aca gat ctc	2836
Gln Glu Asn Leu Lys Ser Met Glu Glu Ile Gln Gly Leu Thr Asp Leu	
920 925 930 935	
caa ctt cag gaa gct gat gaa gag aag gag aga att ctg gcc caa ctc	2884
Gln Leu Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys Glu Arg Ile Leu Ala Gln Leu	
940 945 950	
cga gag tta gag aaa aag aag aaa ctt gaa gat gcc aaa tct cag gag	2932
Arg Glu Leu Glu Lys Lys Lys Lys Leu Glu Asp Ala Lys Ser Gln Glu	
955 960 965	
caa gtt ttt ggt tta gat aaa gaa ctg aag aaa cta aag aaa gcc gtg	2980
Gln Val Phe Gly Leu Asp Lys Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Val	
970 975 980	
gcc acc tct gat aag cta gcc aca gct gag ctc acc att gcc aaa gac	3028
Ala Thr Ser Asp Lys Leu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Ile Ala Lys Asp	
985 990 995	
cag ctg aag tcc ctt cat gga act gtt atg aaa att aac cag gag	3073
Gln Leu Lys Ser Leu His Gly Thr Val Met Lys Ile Asn Gln Glu	
1000 1005 1010	
cga gca gag gag ttg cag gaa gca gag agg ttc agc aga aag gca	3118
Arg Ala Glu Glu Leu Gln Glu Ala Glu Arg Phe Ser Arg Lys Ala	
1015 1020 1025	
gca caa gca gcc aga gat ctc acc cga gca gaa gct gag atc gaa	3163
Ala Gln Ala Ala Arg Asp Leu Thr Arg Ala Glu Ala Glu Ile Glu	
1030 1035 1040	
ctc ctg cag aat ctc ctc agg cag aag ggg gag cag ttt cga ctt	3208
Leu Leu Gln Asn Leu Leu Arg Gln Lys Gly Glu Gln Phe Arg Leu	
1045 1050 1055	
gag atg gag aaa aca ggt gta ggt act gga gca aac tca cag gtc	3253
Glu Met Glu Lys Thr Gly Val Gly Thr Gly Ala Asn Ser Gln Val	
1060 1065 1070	
cta gaa att gag aaa ctg aat gag aca atg gaa cga caa agg aca	3298
Leu Glu Ile Glu Lys Leu Asn Glu Thr Met Glu Arg Gln Arg Thr	
1075 1080 1085	
gag att gca agg ctg cag aat gta cta gac ctc act gga agt gac	3343
Glu Ile Ala Arg Leu Gln Asn Val Leu Asp Leu Thr Gly Ser Asp	
1090 1095 1100	
aac aaa gga ggc ttt gaa aat gtt tta gaa gaa att gct gaa ctt	3388

ES 2 605 646 T3

Asn 1105	Lys	Gly	Gly	Phe	Glu 1110	Asn	Val	Leu	Glu	Glu 1115	Ile	Ala	Glu	Leu	
cga 1120	cgt Arg	gaa Glu	gtt Val	tct Ser	tat Tyr	cag Gln	aat Asn	gat Asp	tac Tyr	ata Ile	agc Ser	agc Ser	atg Met	gca Ala	3433
gat 1135	cct Pro	ttc Phe	aaa Lys	aga Arg	cga Arg	ggc Gly	tat Tyr	tgg Trp	tac Tyr	ttt Phe	atg Met	cca Pro	cca Pro	cca Pro	3478
cca 1150	tca Pro	tca Ser	aaa Lys	gtt Val	tcc Ser	agc Ser	cat His	agt Ser	tcc Ser	cag Gln	gcc Ala	acc Thr	aag Lys	gac Asp	3523
tct 1165	ggt Ser	gtt Val	ggc Gly	ctt Leu	aag Lys	tac Tyr	tca Ser	gcc Ala	tca Ser	act Thr	cct Pro	gtt Val	aga Arg	aaa Lys	3568
cca 1180	cgc Pro	cct Pro	ggg Gly	cag Gln	cag Gln	gat Asp	ggg Gly	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly	agt Ser	caa Gln	cct Pro	ccc Pro	3613
cct 1195	gcc Pro	tca Ala	gga Ser	tac Tyr	tgg Trp	gtt Val	tat Tyr	tct Ser	ccc Pro	atc Ile	agg Arg	agt Ser	ggg Gly	tta Leu	3658
cat 1210	aaa His	ctg Lys	ttt Leu	cca Phe	agt Pro	aga Arg	gat Asp	gca Ala	gac Asp	agt Ser	gga Gly	gga Gly	gat Asp	agt Ser	3703
cag 1225	gaa Gln	gag Glu	agt Ser	gag Glu	ctg Leu	gat Asp	gac Asp	caa Gln	gaa Glu	gaa Glu	ccc Pro	cca Pro	ttt Phe	gtg Val	3748
cct 1240	cct Pro	cct Pro	gga Gly	tac Tyr	atg Met	atg Met	tat Tyr	act Thr	gtg Val	ctt Leu	cct Pro	gat Asp	ggt Gly	tct Ser	3793
cct 1255	gta Pro	ccc Val	cag Pro	ggc Gln	atg Met	gcc Ala	ctg Leu	tat Tyr	gca Ala	cca Pro	cct Pro	cct Pro	ccc Pro	ttg Leu	3838
cca 1270	aac Pro	aat Asn	agc Ser	cga Arg	cct Pro	ctc Leu	acc Thr	cct Pro	ggc Gly	act Thr	gtt Val	gtt Val	tat Tyr	ggc Gly	3883
cca 1285	cct Pro	cct Pro	gct Ala	ggg Gly	gcc Ala	ccc Pro	atg Met	gtg Val	tat Tyr	ggg Gly	cct Pro	cca Pro	ccc Pro	ccc Pro	3928
aac 1300	ttc Asn	tcc Phe	atc Ile	ccc Pro	ttc Phe	atc Ile	cct Pro	atg Met	ggt Gly	gtg Val	ctg Leu	cat His	tgc Cys	aac Asn	3973
gtc 1315	cct Pro	gaa Glu	cac His	cat His	aac Asn	tta Leu	gag Glu	aat Asn	gaa Glu	gtt Val	tct Ser	aga Arg	tta Leu	gaa Glu	4018
gac 1330	ata Asp	atg Ile	cag Met	cat Gln	tta His	aaa Lys	tca Ser	aag Lys	aag Lys	cgg Arg	gaa Glu	gaa Glu	agg Arg	tgg Trp	4063

ES 2 605 646 T3

1330		1335		1340											
atg	aga	gca	tcc	aag	cgg	cag	tcg	gag	aaa	gaa	atg	gaa	gaa	ctg	4108
Met	Arg	Ala	Ser	Lys	Arg	Gln	Ser	Glu	Lys	Glu	Met	Glu	Glu	Leu	
1345					1350					1355					
cat	cat	aat	att	gat	gat	ctt	ttg	caa	gag	aag	aaa	agc	tta	gag	4153
His	His	Asn	Ile	Asp	Asp	Leu	Leu	Gln	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	
1360					1365					1370					
tgt	gaa	gta	gaa	gaa	tta	cat	aga	act	gtc	cag	aaa	cgt	caa	cag	4198
Cys	Glu	Val	Glu	Glu	Leu	His	Arg	Thr	Val	Gln	Lys	Arg	Gln	Gln	
1375					1380					1385					
caa	aag	gac	ttc	att	gat	gga	aat	gtt	gag	agt	ctt	atg	act	gaa	4243
Gln	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Leu	Met	Thr	Glu	
1390					1395					1400					
cta	gaa	ata	gaa	aaa	tca	ctc	aaa	cat	cat	gaa	gat	att	gta	gat	4288
Leu	Glu	Ile	Glu	Lys	Ser	Leu	Lys	His	His	Glu	Asp	Ile	Val	Asp	
1405					1410					1415					
gaa	att	gag	tgc	att	gag	aag	act	ctt	ctg	aaa	cgt	cgc	tca	gag	4333
Glu	Ile	Glu	Cys	Ile	Glu	Lys	Thr	Leu	Leu	Lys	Arg	Arg	Ser	Glu	
1420					1425					1430					
ctc	agg	gaa	gct	gac	cga	ctc	ctg	gca	gag	gct	gag	agt	gaa	ctt	4378
Leu	Arg	Glu	Ala	Asp	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Glu	Ser	Glu	Leu	
1435					1440					1445					
tca	tgc	act	aaa	gaa	aag	aca	aaa	aat	gct	ggt	gaa	aag	ttc	act	4423
Ser	Cys	Thr	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Asn	Ala	Val	Glu	Lys	Phe	Thr	
1450					1455					1460					
gat	gcc	aag	aga	agt	tta	ttg	caa	act	gag	tca	gat	gct	gag	gaa	4468
Asp	Ala	Lys	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Thr	Glu	Ser	Asp	Ala	Glu	Glu	
1465					1470					1475					
tta	gaa	agg	aga	gct	cag	gaa	act	gct	ggt	aac	ctc	gtc	aaa	gct	4513
Leu	Glu	Arg	Arg	Ala	Gln	Glu	Thr	Ala	Val	Asn	Leu	Val	Lys	Ala	
1480					1485					1490					
gat	cag	cag	cta	aga	tcg	ctc	cag	gct	gat	gca	aag	gat	ttg	gag	4558
Asp	Gln	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Ala	Lys	Asp	Leu	Glu	
1495					1500					1505					
cag	cac	aaa	atc	aag	caa	gaa	gaa	atc	ttg	aaa	gaa	ata	aac	aaa	4603
Gln	His	Lys	Ile	Lys	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Glu	Ile	Asn	Lys	
1510					1515					1520					
att	gta	gca	gca	aaa	gac	tca	gac	ttc	caa	tgt	tta	agc	aag	aag	4648
Ile	Val	Ala	Ala	Lys	Asp	Ser	Asp	Phe	Gln	Cys	Leu	Ser	Lys	Lys	
1525					1530					1535					
aag	gaa	aaa	ctg	aca	gaa	gag	ctt	cag	aaa	cta	cag	aaa	gac	ata	4693
Lys	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Glu	Leu	Gln	Lys	Leu	Gln	Lys	Asp	Ile	
1540					1545					1550					
gag	atg	gca	gaa	cgc	aat	gag	gat	cac	cac	ctg	cag	gtc	ctt	aaa	4738
Glu	Met	Ala	Glu	Arg	Asn	Glu	Asp	His	His	Leu	Gln	Val	Leu	Lys	
1555					1560					1565					

ES 2 605 646 T3

gaa tct gag gtg ctt ctt cag gcc aaa aga gcc gag ctg gaa aag Glu Ser Glu Val Leu Leu Gln Ala Lys Arg Ala Glu Leu Glu Lys 1570 1575 1580	4783
ctg aaa agc cag gtg aca agt cag cag cag gag atg gct gtc ttg Leu Lys Ser Gln Val Thr Ser Gln Gln Gln Glu Met Ala Val Leu 1585 1590 1595	4828
gac agg cag tta ggg cat aaa aag gag gag ctg cat cta ctc caa Asp Arg Gln Leu Gly His Lys Lys Glu Glu Leu His Leu Leu Gln 1600 1605 1610	4873
gga agc atg gtc cag gca aaa gct gac ctc cag gaa gct ctg aga Gly Ser Met Val Gln Ala Lys Ala Asp Leu Gln Glu Ala Leu Arg 1615 1620 1625	4918
ctg gga gag act gaa gta act gag aag tgc aat cac att agg gaa Leu Gly Glu Thr Glu Val Thr Glu Lys Cys Asn His Ile Arg Glu 1630 1635 1640	4963
gta aaa tct ctt ctg gaa gaa ctg agt ttt cag aaa gga gaa cta Val Lys Ser Leu Leu Glu Glu Leu Ser Phe Gln Lys Gly Glu Leu 1645 1650 1655	5008
aat gtt cag att agt gaa aga aaa act caa ctt aca ctt ata aag Asn Val Gln Ile Ser Glu Arg Lys Thr Gln Leu Thr Leu Ile Lys 1660 1665 1670	5053
cag gaa att gaa aaa gag gaa gaa aat ctt cag gtt gtt tta agg Gln Glu Ile Glu Lys Glu Glu Glu Asn Leu Gln Val Val Leu Arg 1675 1680 1685	5098
cag atg tct aaa cat aaa acc gaa cta aag aat att ctg gac atg Gln Met Ser Lys His Lys Thr Glu Leu Lys Asn Ile Leu Asp Met 1690 1695 1700	5143
ttg caa ctt gaa aac cat gag cta caa ggt ttg aag cta caa cat Leu Gln Leu Glu Asn His Glu Leu Gln Gly Leu Lys Leu Gln His 1705 1710 1715	5188
gac caa agg gta tct gaa tta gag aag act cag gtg gca gtg cta Asp Gln Arg Val Ser Glu Leu Glu Lys Thr Gln Val Ala Val Leu 1720 1725 1730	5233
gag gag aaa ctg gag tta gag aat ttg cag cag ata tcc cag cag Glu Glu Lys Leu Glu Leu Glu Asn Leu Gln Gln Ile Ser Gln Gln 1735 1740 1745	5278
cag aaa ggg gaa ata gag tgg cag aag cag ctc ctt gag agg gat Gln Lys Gly Glu Ile Glu Trp Gln Lys Gln Leu Leu Glu Arg Asp 1750 1755 1760	5323
aaa cga gaa ata gaa cga atg act gct gag tcc cga gct tta caa Lys Arg Glu Ile Glu Arg Met Thr Ala Glu Ser Arg Ala Leu Gln 1765 1770 1775	5368
tcg tgt gtt gag tgt ttg agc aaa gaa aag gaa gat ctc caa gag Ser Cys Val Glu Cys Leu Ser Lys Glu Lys Glu Asp Leu Gln Glu 1780 1785 1790	5413

ES 2 605 646 T3

aaa	tgt	gac	att	tgg	gaa	aaa	aag	ttg	gca	caa	acc	aaa	agg	gtt	5458
Lys	Cys	Asp	Ile	Trp	Glu	Lys	Lys	Leu	Ala	Gln	Thr	Lys	Arg	Val	
1795					1800					1805					
tta	gca	gca	gca	gaa	gaa	aat	agc	aaa	atg	gag	caa	tca	aac	tta	5503
Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ser	Lys	Met	Glu	Gln	Ser	Asn	Leu	
1810					1815					1820					
gaa	aag	ttg	gaa	ttg	aat	gtc	aga	aaa	ctg	cag	cag	gaa	cta	gac	5548
Glu	Lys	Leu	Glu	Leu	Asn	Val	Arg	Lys	Leu	Gln	Gln	Glu	Leu	Asp	
1825					1830					1835					
caa	cta	aac	aga	gac	aag	ttg	tca	ctg	cat	aac	gac	att	tca	gca	5593
Gln	Leu	Asn	Arg	Asp	Lys	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Asp	Ile	Ser	Ala	
1840					1845					1850					
atg	caa	cag	cag	ctc	caa	gaa	aaa	cga	gaa	gca	gta	aac	tca	ctg	5638
Met	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Glu	Lys	Arg	Glu	Ala	Val	Asn	Ser	Leu	
1855					1860					1865					
cag	gag	gaa	cta	gct	aat	gtc	caa	gac	cat	ttg	aac	cta	gca	aaa	5683
Gln	Glu	Glu	Leu	Ala	Asn	Val	Gln	Asp	His	Leu	Asn	Leu	Ala	Lys	
1870					1875					1880					
cag	gac	ctg	ctt	cac	acc	acc	aag	cat	cag	gat	gtg	ttg	ctc	agt	5728
Gln	Asp	Leu	Leu	His	Thr	Thr	Lys	His	Gln	Asp	Val	Leu	Leu	Ser	
1885					1890					1895					
gag	cag	acc	cga	ctc	cag	aag	gac	atc	agt	gaa	tgg	gca	aat	agg	5773
Glu	Gln	Thr	Arg	Leu	Gln	Lys	Asp	Ile	Ser	Glu	Trp	Ala	Asn	Arg	
1900					1905					1910					
ttt	gaa	gac	tgt	cag	aaa	gaa	gag	gag	aca	aaa	caa	caa	caa	ctt	5818
Phe	Glu	Asp	Cys	Gln	Lys	Glu	Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	Gln	Gln	Leu	
1915					1920					1925					
caa	gtg	ctt	cag	aat	gag	att	gaa	gaa	aac	aag	ctc	aaa	cta	gtc	5863
Gln	Val	Leu	Gln	Asn	Glu	Ile	Glu	Glu	Asn	Lys	Leu	Lys	Leu	Val	
1930					1935					1940					
caa	caa	gaa	atg	atg	ttt	cag	aga	ctc	cag	aaa	gag	aga	gaa	agt	5908
Gln	Gln	Glu	Met	Met	Phe	Gln	Arg	Leu	Gln	Lys	Glu	Arg	Glu	Ser	
1945					1950					1955					
gaa	gaa	agc	aaa	tta	gaa	acc	agt	aaa	gtg	aca	ctg	aag	gag	caa	5953
Glu	Glu	Ser	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Gln	
1960					1965					1970					
cag	cac	cag	ctg	gaa	aag	gaa	tta	aca	gac	cag	aaa	agc	aaa	ctg	5998
Gln	His	Gln	Leu	Glu	Lys	Glu	Leu	Thr	Asp	Gln	Lys	Ser	Lys	Leu	
1975					1980					1985					
gac	caa	gtg	ctc	tca	aag	gtg	ctg	gca	gct	gaa	gag	cgt	ggt	agg	6043
Asp	Gln	Val	Leu	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Ala	Glu	Glu	Arg	Val	Arg	
1990					1995					2000					
act	ctg	cag	gaa	gag	gag	agg	tgg	tgt	gag	agc	ctg	gag	aag	aca	6088
Thr	Leu	Gln	Glu	Glu	Glu	Arg	Trp	Cys	Glu	Ser	Leu	Glu	Lys	Thr	
2005					2010					2015					
ctc	tcc	caa	act	aaa	cgg	cag	ctt	tca	gaa	agg	gag	cag	caa	ttg	6133

ES 2 605 646 T3

Leu 2020	Ser	Gln	Thr	Lys	Arg 2025	Gln	Leu	Ser	Glu	Arg 2030	Glu	Gln	Gln	Leu	
gtg Val 2035	gag Glu	aaa Lys	tca Ser	ggt Gly	gag Glu 2040	ctg Leu	ttg Leu	gcc Ala	ctc Leu	cag Gln 2045	aaa Lys	gag Glu	gca Ala	gat Asp	6178
tct Ser 2050	atg Met	agg Arg	gca Ala	gac Asp	ttc Phe 2055	agc Ser	ctt Leu	ctg Leu	cgg Arg	aac Asn 2060	cag Gln	ttc Phe	ttg Leu	aca Thr	6223
gaa Glu 2065	aga Arg	aag Lys	aaa Lys	gct Ala	gag Glu 2070	aag Lys	cag Gln	gtg Val	gcc Ala	agc Ser 2075	ctg Leu	aag Lys	gaa Glu	gca Ala	6268
ctt Leu 2080	aag Lys	atc Ile	cag Gln	cgg Arg	agc Ser 2085	cag Gln	ctg Leu	gag Glu	aaa Lys	aac Asn 2090	ctt Leu	ctt Leu	gag Glu	caa Gln	6313
aaa Lys 2095	cag Gln	gag Glu	aac Asn	agc Ser	tgc Cys 2100	ata Ile	caa Gln	aag Lys	gaa Glu	atg Met 2105	gca Ala	aca Thr	att Ile	gaa Glu	6358
ctg Leu 2110	gta Val	gcc Ala	cag Gln	gac Asp	aac Asn 2115	cat His	gag Glu	cgg Arg	gcc Ala	agg Arg 2120	cgc Arg	ctg Leu	atg Met	aag Lys	6403
gag Glu 2125	ctc Leu	aac Asn	cag Gln	atg Met	cag Gln 2130	tat Tyr	gag Glu	tac Tyr	acg Thr	gag Glu 2135	ctc Leu	aag Lys	aaa Lys	cag Gln	6448
atg Met 2140	gca Ala	aac Asn	caa Gln	aaa Lys	gat Asp 2145	ttg Leu	gag Glu	aga Arg	aga Arg	caa Gln 2150	atg Met	gaa Glu	atc Ile	agt Ser	6493
gat Asp 2155	gca Ala	atg Met	agg Arg	aca Thr	ctt Leu 2160	aaa Lys	tct Ser	gag Glu	gtg Val	aag Lys 2165	gat Asp	gaa Glu	atc Ile	aga Arg	6538
acc Thr 2170	agc Ser	ttg Leu	aag Lys	aat Asn	ctt Leu 2175	aat Asn	cag Gln	ttt Phe	ctt Leu	cca Pro 2180	gaa Glu	cta Leu	cca Pro	gca Ala	6583
gat Asp 2185	cta Leu	gaa Glu	gct Ala	att Ile	ttg Leu 2190	gaa Glu	aga Arg	aac Asn	gaa Glu	aac Asn 2195	cta Leu	gaa Glu	gga Gly	gaa Glu	6628
ttg Leu 2200	gaa Glu	agc Ser	ttg Leu	aaa Lys	gag Glu 2205	aac Asn	ctt Leu	cca Pro	ttt Phe	acc Thr 2210	atg Met	aat Asn	gag Glu	gga Gly	6673
cct Pro 2215	ttt Phe	gaa Glu	gaa Glu	aaa Lys	ctg Leu 2220	aac Asn	ttt Phe	tcc Ser	caa Gln	gtt Val 2225	cac His	ata Ile	atg Met	gat Asp	6718
gaa Glu 2230	cac His	tgg Trp	cgt Arg	gga Gly	gaa Glu 2235	gca Ala	ctc Leu	cgg Arg	gag Glu	aaa Lys 2240	ctg Leu	cgt Arg	cac His	cgg Arg	6763
gaa Glu	gac Asp	cga Arg	ctc Leu	aag Lys	gcc Ala	caa Gln	ctc Leu	cga Arg	cac His	tgt Cys	atg Met	tcc Ser	aag Lys	caa Gln	6808

ES 2 605 646 T3

2245		2250		2255		
gca gaa gta tta att aaa	gga aag cgg cag aca	gag ggc act tta	6853			
Ala Glu Val Leu Ile Lys	Gly Lys Arg Gln Thr	Glu Gly Thr Leu				
2260	2265	2270				
cac agt ttg agg aga caa	gta gat gct tta ggg	gaa ttg gtc acc	6898			
His Ser Leu Arg Arg Gln	Val Asp Ala Leu Gly	Glu Leu Val Thr				
2275	2280	2285				
agc acc tct gca gat tca	gcg tca tca ccc agt	ctg tct cag ctg	6943			
Ser Thr Ser Ala Asp Ser	Ala Ser Ser Pro Ser	Leu Ser Gln Leu				
2290	2295	2300				
gag tct tcc ctc aca gag	gac tct caa ctt gga	caa aat cag gaa	6988			
Glu Ser Ser Leu Thr Glu	Asp Ser Gln Leu Gly	Gln Asn Gln Glu				
2305	2310	2315				
aag aat gcc tca gcc aga	tga ggaatactgt cttgtgtaaa	tatattcaag	7039			
Lys Asn Ala Ser Ala Arg						
2320	2325					
gaaaacacct ccaactacctc actgacttca taattggaat gtcacatggt ttttttaatc			7099			
aagatgcagt gaactgagat tctgaaactc cactgtagtt tactttgcct gtaccattaa			7159			
tgccaatggt tttataaatc acttgtacat agtacatatg ggaatagttg catatgggaa			7219			
tttaaaccaa catgtggctg agcctttttt tttttaatct tcgtaacatg tttaaaaaaaa			7279			
aacagtgatt ttaactgcat atttgaacct acaaaactggt aaatcttatt aacaaaaaga			7339			
atgtacttaa ggccctcttt atttatagtg tcgagttatt tttgaatttt gcttaaaatc			7399			
tatttttcat atgaaaataa aagataacaa tc			7431			

<210> 28  
 <211> 2325  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 28

ES 2 605 646 T3

Met Lys Lys Gly Ser Gln Gln Lys Ile Phe Ser Lys Ala Lys Ile Pro  
1 5 10 15

Ser Ser Ser His Ser Pro Ile Pro Ser Ser Met Ser Asn Met Arg Ser  
20 25 30

Arg Ser Leu Ser Pro Leu Ile Gly Ser Glu Thr Leu Pro Phe His Ser  
35 40 45

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

Leu Leu Asp Tyr Gln Asp His Lys Gly Ala Asp Ser His Ala Gly Val



ES 2 605 646 T3

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

ES 2 605 646 T3

Glu Gln Gln Leu Asp Ile Met Asn Lys Gln Tyr Gln Gln Leu Glu Ser  
 565 570 575

Arg Leu Asp Glu Ile Leu Ser Arg Ile Ala Lys Glu Thr Glu Glu Ile  
 580 585 590

Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Thr Glu Gly Gln Ile Ala Ala Asn Glu  
 595 600 605

Ala Leu Lys Lys Asp Leu Glu Gly Val Ile Ser Gly Leu Gln Glu Tyr  
 610 615 620

Leu Gly Thr Ile Lys Gly Gln Ala Thr Gln Ala Gln Asn Glu Cys Arg  
 625 630 635 640

Lys Leu Arg Asp Glu Lys Glu Thr Leu Leu Gln Arg Leu Thr Glu Val  
 645 650 655

Glu Gln Glu Arg Asp Gln Leu Glu Ile Val Ala Met Asp Ala Glu Asn  
 660 665 670

Met Arg Lys Glu Leu Ala Glu Leu Glu Ser Ala Leu Gln Glu Gln His  
 675 680 685

Glu Val Asn Ala Ser Leu Gln Gln Thr Gln Gly Asp Leu Ser Ala Tyr  
 690 695 700

Glu Ala Glu Leu Glu Ala Arg Leu Asn Leu Arg Asp Ala Glu Ala Asn  
 705 710 715 720

Gln Leu Lys Glu Glu Leu Glu Lys Val Thr Arg Leu Thr Gln Leu Glu  
 725 730 735

Gln Ser Ala Leu Gln Ala Glu Leu Glu Lys Glu Arg Gln Ala Leu Lys  
 740 745 750

Asn Ala Leu Gly Lys Ala Gln Phe Ser Glu Glu Lys Glu Gln Glu Asn  
 755 760 765

Ser Glu Leu His Ala Lys Leu Lys His Leu Gln Asp Asp Asn Asn Leu  
 770 775 780

Leu Lys Gln Gln Leu Lys Asp Phe Gln Asn His Leu Asn His Val Val  
 785 790 795 800

ES 2 605 646 T3

Asp Gly Leu Val Arg Pro Glu Glu Val Ala Ala Arg Val Asp Glu Leu  
805 810 815

Arg Arg Lys Leu Lys Leu Gly Thr Gly Glu Met Asn Ile His Ser Pro  
820 825 830

Ser Asp Val Leu Gly Lys Ser Leu Ala Asp Leu Gln Lys Gln Phe Ser  
835 840 845

Glu Ile Leu Ala Arg Ser Lys Trp Glu Arg Asp Glu Ala Gln Val Arg  
850 855 860

Glu Arg Lys Leu Gln Glu Glu Met Ala Leu Gln Gln Glu Lys Leu Ala  
865 870 875 880

Thr Gly Gln Glu Glu Phe Arg Gln Ala Cys Glu Arg Ala Leu Glu Ala  
885 890 895

Arg Met Asn Phe Asp Lys Arg Gln His Glu Ala Arg Ile Gln Gln Met  
900 905 910

Glu Asn Glu Ile His Tyr Leu Gln Glu Asn Leu Lys Ser Met Glu Glu  
915 920 925

Ile Gln Gly Leu Thr Asp Leu Gln Leu Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys  
930 935 940

Glu Arg Ile Leu Ala Gln Leu Arg Glu Leu Glu Lys Lys Lys Lys Leu  
945 950 955 960

Glu Asp Ala Lys Ser Gln Glu Gln Val Phe Gly Leu Asp Lys Glu Leu  
965 970 975

Lys Lys Leu Lys Lys Ala Val Ala Thr Ser Asp Lys Leu Ala Thr Ala  
980 985 990

Glu Leu Thr Ile Ala Lys Asp Gln Leu Lys Ser Leu His Gly Thr Val  
995 1000 1005

Met Lys Ile Asn Gln Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gln Glu Ala Glu  
1010 1015 1020

Arg Phe Ser Arg Lys Ala Ala Gln Ala Ala Arg Asp Leu Thr Arg  
1025 1030 1035

Ala Glu Ala Glu Ile Glu Leu Leu Gln Asn Leu Leu Arg Gln Lys

ES 2 605 646 T3

1040						1045						1050			
Gly	Glu	Gln	Phe	Arg	Leu	Glu	Met	Glu	Lys	Thr	Gly	Val	Gly	Thr	
1055						1060					1065				
Gly	Ala	Asn	Ser	Gln	Val	Leu	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Thr	
1070						1075					1080				
Met	Glu	Arg	Gln	Arg	Thr	Glu	Ile	Ala	Arg	Leu	Gln	Asn	Val	Leu	
1085						1090					1095				
Asp	Leu	Thr	Gly	Ser	Asp	Asn	Lys	Gly	Gly	Phe	Glu	Asn	Val	Leu	
1100						1105					1110				
Glu	Glu	Ile	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Glu	Val	Ser	Tyr	Gln	Asn	Asp	
1115						1120					1125				
Tyr	Ile	Ser	Ser	Met	Ala	Asp	Pro	Phe	Lys	Arg	Arg	Gly	Tyr	Trp	
1130						1135					1140				
Tyr	Phe	Met	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Lys	Val	Ser	Ser	His	Ser	
1145						1150					1155				
Ser	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp	Ser	Gly	Val	Gly	Leu	Lys	Tyr	Ser	Ala	
1160						1165					1170				
Ser	Thr	Pro	Val	Arg	Lys	Pro	Arg	Pro	Gly	Gln	Gln	Asp	Gly	Lys	
1175						1180					1185				
Glu	Gly	Ser	Gln	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Tyr	Trp	Val	Tyr	Ser	
1190						1195					1200				
Pro	Ile	Arg	Ser	Gly	Leu	His	Lys	Leu	Phe	Pro	Ser	Arg	Asp	Ala	
1205						1210					1215				
Asp	Ser	Gly	Gly	Asp	Ser	Gln	Glu	Glu	Ser	Glu	Leu	Asp	Asp	Gln	
1220						1225					1230				
Glu	Glu	Pro	Pro	Phe	Val	Pro	Pro	Pro	Gly	Tyr	Met	Met	Tyr	Thr	
1235						1240					1245				
Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Pro	Gln	Gly	Met	Ala	Leu	Tyr	
1250						1255					1260				
Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Asn	Asn	Ser	Arg	Pro	Leu	Thr	Pro	
1265						1270					1275				

ES 2 605 646 T3

Gly Thr Val Val Tyr Gly Pro Pro Pro Ala Gly Ala Pro Met Val  
1280 1285 1290

Tyr Gly Pro Pro Pro Pro Asn Phe Ser Ile Pro Phe Ile Pro Met  
1295 1300 1305

Gly Val Leu His Cys Asn Val Pro Glu His His Asn Leu Glu Asn  
1310 1315 1320

Glu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ile Met Gln His Leu Lys Ser Lys  
1325 1330 1335

Lys Arg Glu Glu Arg Trp Met Arg Ala Ser Lys Arg Gln Ser Glu  
1340 1345 1350

Lys Glu Met Glu Glu Leu His His Asn Ile Asp Asp Leu Leu Gln  
1355 1360 1365

Glu Lys Lys Ser Leu Glu Cys Glu Val Glu Glu Leu His Arg Thr  
1370 1375 1380

Val Gln Lys Arg Gln Gln Gln Lys Asp Phe Ile Asp Gly Asn Val  
1385 1390 1395

Glu Ser Leu Met Thr Glu Leu Glu Ile Glu Lys Ser Leu Lys His  
1400 1405 1410

His Glu Asp Ile Val Asp Glu Ile Glu Cys Ile Glu Lys Thr Leu  
1415 1420 1425

Leu Lys Arg Arg Ser Glu Leu Arg Glu Ala Asp Arg Leu Leu Ala  
1430 1435 1440

Glu Ala Glu Ser Glu Leu Ser Cys Thr Lys Glu Lys Thr Lys Asn  
1445 1450 1455

Ala Val Glu Lys Phe Thr Asp Ala Lys Arg Ser Leu Leu Gln Thr  
1460 1465 1470

Glu Ser Asp Ala Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ala Gln Glu Thr Ala  
1475 1480 1485

Val Asn Leu Val Lys Ala Asp Gln Gln Leu Arg Ser Leu Gln Ala  
1490 1495 1500

ES 2 605 646 T3

Asp Ala Lys Asp Leu Glu Gln His Lys Ile Lys Gln Glu Glu Ile  
 1505 1510 1515  
  
 Leu Lys Glu Ile Asn Lys Ile Val Ala Ala Lys Asp Ser Asp Phe  
 1520 1525 1530  
  
 Gln Cys Leu Ser Lys Lys Lys Glu Lys Leu Thr Glu Glu Leu Gln  
 1535 1540 1545  
  
 Lys Leu Gln Lys Asp Ile Glu Met Ala Glu Arg Asn Glu Asp His  
 1550 1555 1560  
  
 His Leu Gln Val Leu Lys Glu Ser Glu Val Leu Leu Gln Ala Lys  
 1565 1570 1575  
  
 Arg Ala Glu Leu Glu Lys Leu Lys Ser Gln Val Thr Ser Gln Gln  
 1580 1585 1590  
  
 Gln Glu Met Ala Val Leu Asp Arg Gln Leu Gly His Lys Lys Glu  
 1595 1600 1605  
  
 Glu Leu His Leu Leu Gln Gly Ser Met Val Gln Ala Lys Ala Asp  
 1610 1615 1620  
  
 Leu Gln Glu Ala Leu Arg Leu Gly Glu Thr Glu Val Thr Glu Lys  
 1625 1630 1635  
  
 Cys Asn His Ile Arg Glu Val Lys Ser Leu Leu Glu Glu Leu Ser  
 1640 1645 1650  
  
 Phe Gln Lys Gly Glu Leu Asn Val Gln Ile Ser Glu Arg Lys Thr  
 1655 1660 1665  
  
 Gln Leu Thr Leu Ile Lys Gln Glu Ile Glu Lys Glu Glu Glu Asn  
 1670 1675 1680  
  
 Leu Gln Val Val Leu Arg Gln Met Ser Lys His Lys Thr Glu Leu  
 1685 1690 1695  
  
 Lys Asn Ile Leu Asp Met Leu Gln Leu Glu Asn His Glu Leu Gln  
 1700 1705 1710  
  
 Gly Leu Lys Leu Gln His Asp Gln Arg Val Ser Glu Leu Glu Lys  
 1715 1720 1725

ES 2 605 646 T3

Thr Gln Val Ala Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Leu Glu Asn Leu  
1730 1735 1740

Gln Gln Ile Ser Gln Gln Gln Lys Gly Glu Ile Glu Trp Gln Lys  
1745 1750 1755

Gln Leu Leu Glu Arg Asp Lys Arg Glu Ile Glu Arg Met Thr Ala  
1760 1765 1770

Glu Ser Arg Ala Leu Gln Ser Cys Val Glu Cys Leu Ser Lys Glu  
1775 1780 1785

Lys Glu Asp Leu Gln Glu Lys Cys Asp Ile Trp Glu Lys Lys Leu  
1790 1795 1800

Ala Gln Thr Lys Arg Val Leu Ala Ala Ala Glu Glu Asn Ser Lys  
1805 1810 1815

Met Glu Gln Ser Asn Leu Glu Lys Leu Glu Leu Asn Val Arg Lys  
1820 1825 1830

Leu Gln Gln Glu Leu Asp Gln Leu Asn Arg Asp Lys Leu Ser Leu  
1835 1840 1845

His Asn Asp Ile Ser Ala Met Gln Gln Gln Leu Gln Glu Lys Arg  
1850 1855 1860

Glu Ala Val Asn Ser Leu Gln Glu Glu Leu Ala Asn Val Gln Asp  
1865 1870 1875

His Leu Asn Leu Ala Lys Gln Asp Leu Leu His Thr Thr Lys His  
1880 1885 1890

Gln Asp Val Leu Leu Ser Glu Gln Thr Arg Leu Gln Lys Asp Ile  
1895 1900 1905

Ser Glu Trp Ala Asn Arg Phe Glu Asp Cys Gln Lys Glu Glu Glu  
1910 1915 1920

Thr Lys Gln Gln Gln Leu Gln Val Leu Gln Asn Glu Ile Glu Glu  
1925 1930 1935

Asn Lys Leu Lys Leu Val Gln Gln Glu Met Met Phe Gln Arg Leu  
1940 1945 1950

Gln Lys Glu Arg Glu Ser Glu Glu Ser Lys Leu Glu Thr Ser Lys

# ES 2 605 646 T3

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

ES 2 605 646 T3

Glu Asn Leu Glu Gly Glu Leu Glu Ser Leu Lys Glu Asn Leu Pro  
 2195 2200 2205

Phe Thr Met Asn Glu Gly Pro Phe Glu Glu Lys Leu Asn Phe Ser  
 2210 2215 2220

Gln Val His Ile Met Asp Glu His Trp Arg Gly Glu Ala Leu Arg  
 2225 2230 2235

Glu Lys Leu Arg His Arg Glu Asp Arg Leu Lys Ala Gln Leu Arg  
 2240 2245 2250

His Cys Met Ser Lys Gln Ala Glu Val Leu Ile Lys Gly Lys Arg  
 2255 2260 2265

Gln Thr Glu Gly Thr Leu His Ser Leu Arg Arg Gln Val Asp Ala  
 2270 2275 2280

Leu Gly Glu Leu Val Thr Ser Thr Ser Ala Asp Ser Ala Ser Ser  
 2285 2290 2295

Pro Ser Leu Ser Gln Leu Glu Ser Ser Leu Thr Glu Asp Ser Gln  
 2300 2305 2310

Leu Gly Gln Asn Gln Glu Lys Asn Ala Ser Ala Arg  
 2315 2320 2325

5 <210> 29  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 29  
 gcagcaaaag actcagac 18

15 <210> 30  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 30  
 aagttgcaac atgtccag 18

25 <210> 31  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

ES 2 605 646 T3

```

<220>
<223> cebador

<400> 31
5  catatggagc aagaggaaat cttgaaag                28

<210> 32
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

15 <400> 32
    ggtaccgggt cggtgcgct c                21

<210> 33
<211> 24
20 <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> cebador

25 <400> 33
    ggatccatca agcaagaaga aatc            24

<210> 34
<211> 25
30 <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> cebador

35 <400> 34
    gtcgactcat ctggctgagg cattc            25

<210> 35
<211> 826
40 <212> PRT
    <213> Canis familiaris

45 <400> 35

    Met Glu Gln Glu Glu Ile Leu Lys Glu Ile Asn Lys Val Val Ala Ala
      1           5           10           15

    Lys Asp Ser Asp Phe Gln Ser Leu Asn Lys Lys Lys Glu Val Leu Thr
  
```



ES 2 605 646 T3

Leu Cys Lys Glu Lys Gln Asp Leu Glu Glu Lys Gln Asp Ser Trp Glu  
 275 280 285  
 Lys Lys Leu Ala Gln Thr Lys Arg Val Leu Ala Ala Ala Glu Glu Asp  
 290 300  
 Ser Glu Met Glu Arg Ala Arg Leu Glu Lys Leu Glu Leu Asp Ala Arg  
 305 310 315 320  
 Lys Leu Gln Gln Glu Leu Asp Gln Arg Asn Arg Glu Lys Leu Ser Leu  
 325 330 335  
 His Gln Asp Leu Ala Val Val Gln Gln Gln Leu Gln Glu Lys Gln Glu  
 340 345 350  
 Ala Val Asn Ser Leu Gln Lys Glu Leu Thr Asp Val Gln Glu His Leu  
 355 360 365  
 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Val Leu Cys Thr Thr Lys Arg Lys Asp Ala  
 370 375 380  
 Leu Leu Ser Glu Gln Thr Arg Leu Glu Lys Asp Val Gly Glu Trp Thr  
 385 390 395 400  
 Lys Lys Phe Glu Asp Cys Gln Lys Glu Gly Glu Thr Lys Gln Gln Gln  
 405 410 415  
 Leu Gln Gly Leu Gln Lys Glu Ile Glu Gly Asn Glu Ala Lys Leu Ala  
 420 425 430  
 Gln Gln Glu Met Met Phe Gln Arg Leu Gln Lys Glu Arg Glu Cys Glu  
 435 440 445  
 Glu Lys Lys Leu Glu Ala Ser Lys Val Thr Leu Lys Glu Gln Gln Gln  
 450 455 460  
 Gln Leu Glu Lys Glu Leu Met Glu Gln Lys Gly Lys Leu Asp Gln Val  
 465 470 475 480  
 Leu Ala Lys Leu Leu Val Ala Glu Glu Arg Val Arg Thr Leu Gln Glu  
 485 490 495  
 Glu Gly Arg Trp Ser Glu Thr Leu Glu Lys Thr Leu Ser Gln Thr Lys  
 500 505 510

ES 2 605 646 T3

Arg Gln Leu Ser Glu Arg Glu Gln Gln Leu Leu Ala Lys Ser Asp Glu  
515 520 525

Leu Leu Ala Leu Gln Lys Glu Thr Asp Ser Met Arg Ala Asp Phe Ser  
530 535 540

Leu Leu Arg Asn Gln Phe Leu Thr Glu Arg Lys Lys Ala Glu Lys Gln  
545 550 555 560

Val Ala Ser Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Gln Arg Ser Gln Leu Glu  
565 570 575

Lys Asn Leu Leu Glu Gln Lys Gln Glu Asn Ser Cys Met Gln Arg Glu  
580 585 590

Met Ala Thr Ile Glu Gln Val Ala Gln Asp Asn His Glu Arg Ala Arg  
595 600 605

Arg Leu Met Arg Glu Leu Asn Gln Met Gln Arg Glu Tyr Val Glu Leu  
610 615 620

Arg Lys Gln Met Thr Asn Gln Lys Asp Leu Glu Arg Arg Gln Met Glu  
625 630 635 640

Ile Ser Asp Ala Met Gln Ala Leu Lys Cys Glu Val Lys Asp Glu Ile  
645 650 655

Arg Thr Ser Leu Lys Asn Leu Asn Gln Phe Leu Pro Glu Leu Pro Ala  
660 665 670

Asp Leu Glu Ala Leu Leu Glu Arg Asn Glu Asn Leu Gly Gly Gly Leu  
675 680 685

Glu Ser Leu Lys Glu Asn Phe Pro Phe Thr Val Ser Asp Arg Pro Ser  
690 695 700

Ser Cys Glu Glu Lys Leu Asn Phe Gly Gln Ala His Val Ala Asp Glu  
705 710 715 720

Gln Trp Arg Gly Glu Ala Leu Arg Glu Lys Leu Arg His Arg Glu Asp  
725 730 735

Arg Leu Lys Ala Gln Leu Arg Arg Cys Met Ser Lys Gln Ala Glu Val  
740 745 750

ES 2 605 646 T3

Leu Ser Glu Gly Arg Arg Arg Thr Glu Gly Thr Leu His Ser Leu Arg  
755 760 765

Arg Gln Val Asp Ala Leu Gly Glu Leu Val Thr Ser Thr Ser Gly Asp  
770 775 780

Ser Ala Ser Thr Arg Ser Leu Ser Arg Thr Glu Gly Ser Leu Ala Glu  
785 790 795 800

Asp Glu Pro Pro Gly Pro Ser Gln Ser Ser Arg Arg Leu Pro Arg Gly  
805 810 815

Pro Ser Pro Arg Leu Asp Ala His Arg Pro  
820 825

<210> 36  
<211> 813  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 36

Ile Lys Gln Glu Glu Ile Leu Lys Glu Ile Asn Lys Ile Val Ala Ala  
1 5 10 15

Lys Asp Ser Asp Phe Gln Cys Leu Ser Lys Lys Lys Glu Lys Leu Thr  
20 25 30

Glu Glu Leu Gln Lys Leu Gln Lys Asp Ile Glu Met Ala Glu Arg Asn  
35 40 45

Glu Asp His His Leu Gln Val Leu Lys Glu Ser Glu Val Leu Leu Gln  
50 55 60

Ala Lys Arg Ala Glu Leu Glu Lys Leu Lys Ser Gln Val Thr Ser Gln  
65 70 75 80

Gln Gln Glu Met Ala Val Leu Asp Arg Gln Leu Gly His Lys Lys Glu  
85 90 95

Glu Leu His Leu Leu Gln Gly Ser Met Val Gln Ala Lys Ala Asp Leu  
100 105 110

Gln Glu Ala Leu Arg Leu Gly Glu Thr Glu Val Thr Glu Lys Cys Asn  
115 120 125

His Ile Arg Glu Val Lys Ser Leu Leu Glu Glu Leu Ser Phe Gln Lys  
130 135 140

10

ES 2 605 646 T3

Gly Glu Leu Asn Val Gln Ile Ser Glu Arg Lys Thr Gln Leu Thr Leu  
145 150 155 160

Ile Lys Gln Glu Ile Glu Lys Glu Glu Glu Asn Leu Gln Val Val Leu  
165 170 175

Arg Gln Met Ser Lys His Lys Thr Glu Leu Lys Asn Ile Leu Asp Met  
180 185 190

Leu Gln Leu Glu Asn His Glu Leu Gln Gly Leu Lys Leu Gln His Asp  
195 200 205

Gln Arg Val Ser Glu Leu Glu Lys Thr Gln Val Ala Val Leu Glu Glu  
210 215 220

Lys Leu Glu Leu Glu Asn Leu Gln Gln Ile Ser Gln Gln Gln Lys Gly  
225 230 235 240

Glu Ile Glu Trp Gln Lys Gln Leu Leu Glu Arg Asp Lys Arg Glu Ile  
245 250 255

Glu Arg Met Thr Ala Glu Ser Arg Ala Leu Gln Ser Cys Val Glu Cys  
260 265 270

Leu Ser Lys Glu Lys Glu Asp Leu Gln Glu Lys Cys Asp Ile Trp Glu  
275 280 285

Lys Lys Leu Ala Gln Thr Lys Arg Val Leu Ala Ala Ala Glu Glu Asn  
290 295 300

Ser Lys Met Glu Gln Ser Asn Leu Glu Lys Leu Glu Leu Asn Val Arg  
305 310 315 320

Lys Leu Gln Gln Glu Leu Asp Gln Leu Asn Arg Asp Lys Leu Ser Leu  
325 330 335

His Asn Asp Ile Ser Ala Met Gln Gln Gln Leu Gln Glu Lys Arg Glu  
340 345 350

Ala Val Asn Ser Leu Gln Glu Glu Leu Ala Asn Val Gln Asp His Leu  
355 360 365

Asn Leu Ala Lys Gln Asp Leu Leu His Thr Thr Lys His Gln Asp Val  
370 375 380

ES 2 605 646 T3

Leu Leu Ser Glu Gln Thr Arg Leu Gln Lys Asp Ile Ser Glu Trp Ala  
 385 390 395 400

Asn Arg Phe Glu Asp Cys Gln Lys Glu Glu Glu Thr Lys Gln Gln Gln  
 405 410 415

Leu Gln Val Leu Gln Asn Glu Ile Glu Glu Asn Lys Leu Lys Leu Val  
 420 425 430

Gln Gln Glu Met Met Phe Gln Arg Leu Gln Lys Glu Arg Glu Ser Glu  
 435 440 445

Glu Ser Lys Leu Glu Thr Ser Lys Val Thr Leu Lys Glu Gln Gln His  
 450 455 460

Gln Leu Glu Lys Glu Leu Thr Asp Gln Lys Ser Lys Leu Asp Gln Val  
 465 470 475 480

Leu Ser Lys Val Leu Ala Ala Glu Glu Arg Val Arg Thr Leu Gln Glu  
 485 490 495

Glu Glu Arg Trp Cys Glu Ser Leu Glu Lys Thr Leu Ser Gln Thr Lys  
 500 505 510

Arg Gln Leu Ser Glu Arg Glu Gln Gln Leu Val Glu Lys Ser Gly Glu  
 515 520 525

Leu Leu Ala Leu Gln Lys Glu Ala Asp Ser Met Arg Ala Asp Phe Ser  
 530 535 540

Leu Leu Arg Asn Gln Phe Leu Thr Glu Arg Lys Lys Ala Glu Lys Gln  
 545 550 555 560

Val Ala Ser Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Gln Arg Ser Gln Leu Glu  
 565 570 575

Lys Asn Leu Leu Glu Gln Lys Gln Glu Asn Ser Cys Ile Gln Lys Glu  
 580 585 590

Met Ala Thr Ile Glu Leu Val Ala Gln Asp Asn His Glu Arg Ala Arg  
 595 600 605

Arg Leu Met Lys Glu Leu Asn Gln Met Gln Tyr Glu Tyr Thr Glu Leu  
 610 615 620

ES 2 605 646 T3

Lys Lys Gln Met Ala Asn Gln Lys Asp Leu Glu Arg Arg Gln Met Glu  
625 630 635 640

Ile Ser Asp Ala Met Arg Thr Leu Lys Ser Glu Val Lys Asp Glu Ile  
645 650 655

Arg Thr Ser Leu Lys Asn Leu Asn Gln Phe Leu Pro Glu Leu Pro Ala  
660 665 670

Asp Leu Glu Ala Ile Leu Glu Arg Asn Glu Asn Leu Glu Gly Glu Leu  
675 680 685

Glu Ser Leu Lys Glu Asn Leu Pro Phe Thr Met Asn Glu Gly Pro Phe  
690 695 700

Glu Glu Lys Leu Asn Phe Ser Gln Val His Ile Met Asp Glu His Trp  
705 710 715 720

Arg Gly Glu Ala Leu Arg Glu Lys Leu Arg His Arg Glu Asp Arg Leu  
725 730 735

Lys Ala Gln Leu Arg His Cys Met Ser Lys Gln Ala Glu Val Leu Ile  
740 745 750

Lys Gly Lys Arg Gln Thr Glu Gly Thr Leu His Ser Leu Arg Arg Gln  
755 760 765

Val Asp Ala Leu Gly Glu Leu Val Thr Ser Thr Ser Ala Asp Ser Ala  
770 775 780

Ser Ser Pro Ser Leu Ser Gln Leu Glu Ser Ser Leu Thr Glu Asp Ser  
785 790 795 800

Gln Leu Gly Gln Asn Gln Glu Lys Asn Ala Ser Ala Arg  
805 810

<210> 37  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> cebador

10

<400> 37  
ggatccatga agaaagggtc tcag 24

15

<210> 38  
<211> 24  
<212> ADN

ES 2 605 646 T3

<213> Artificial

<220>  
<223> cebador

5 <400> 38  
gtcgactcag ggctcgggtgcg cgtc 24

10 <210> 39  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> cebador

<400> 39  
ggatccatga agaaagggtc tcaac 25

20 <210> 40  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> cebador

<400> 40  
gtcgactcat ctggctgagg cattc 25

30 <210> 41  
<211> 7770  
<212> ADN  
<213> *Canis familiaris*

35 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(7770)  
<223>

40 <400> 41

atg aag aaa ggt tct cag caa aag ttt ttg aaa gca aag atg cca cca 48  
Met Lys Lys Gly Ser Gln Gln Lys Phe Leu Lys Ala Lys Met Pro Pro  
1 5 10 15

tca tct cac tct cct agt cca cca tcc ctt acg tcc aat atg aga tct 96  
Ser Ser His Ser Pro Ser Pro Pro Ser Leu Thr Ser Asn Met Arg Ser  
20 25 30

agg tca ctt tcg cct cta agt gga tct gag act ctg cct ttt cat ttt 144  
Arg Ser Leu Ser Pro Leu Ser Gly Ser Glu Thr Leu Pro Phe His Phe  
35 40 45

gga gga ccg tgg cat gag caa gtt gag att aca gat gaa agc aca gtg 192  
Gly Gly Pro Trp His Glu Gln Val Glu Ile Thr Asp Glu Ser Thr Val  
50 55 60

ES 2 605 646 T3

gtt tta gac tac caa gac cat aaa gaa gct gat tca cat gca gga gtc	240
Val Leu Asp Tyr Gln Asp His Lys Glu Ala Asp Ser His Ala Gly Val	
65 70 75 80	
cga tat att aca gag gcc ctt gtt aga aaa ctt act aaa cag gac aat	288
Arg Tyr Ile Thr Glu Ala Leu Val Arg Lys Leu Thr Lys Gln Asp Asn	
85 90 95	
ttg gcc ttg gta aaa tct ctg aac ctt tca ctt gct aaa ggt ggt ggc	336
Leu Ala Leu Val Lys Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ala Lys Gly Gly Gly	
100 105 110	
aag aaa ttc agg tgt atc gaa aat ttg gaa aaa tgt gtt aaa ctt gaa	384
Lys Lys Phe Arg Cys Ile Glu Asn Leu Glu Lys Cys Val Lys Leu Glu	
115 120 125	
gta ctg aat ctc agc tat aat cta ata gga aag att gag aaa gtg gac	432
Val Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Leu Ile Gly Lys Ile Glu Lys Val Asp	
130 135 140	
aaa ctg tta aaa tta cgt gaa ctc aac tta tcg tat aac aaa atc cgc	480
Lys Leu Leu Lys Leu Arg Glu Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Lys Ile Arg	
145 150 155 160	
aaa att gaa ggc ata gaa aat tta tat aat ctg caa aag ctg aac ctt	528
Lys Ile Glu Gly Ile Glu Asn Leu Tyr Asn Leu Gln Lys Leu Asn Leu	
165 170 175	
gca gga aat gaa atc gaa cat atc cca gta tgg tta ggg aag aag tta	576
Ala Gly Asn Glu Ile Glu His Ile Pro Val Trp Leu Gly Lys Lys Leu	
180 185 190	
aaa tct ttg cga atc ctg aat ctg aaa ggc aac aag ata tca tcg ctc	624
Lys Ser Leu Arg Ile Leu Asn Leu Lys Gly Asn Lys Ile Ser Ser Leu	
195 200 205	
caa gat gta agc aag ttg aaa cca ctt caa gat ttg act tct ctg atc	672
Gln Asp Val Ser Lys Leu Lys Pro Leu Gln Asp Leu Thr Ser Leu Ile	
210 215 220	
cta ctt gaa aat cca gtt gcg acc ctt cct cat tat atc cag ttt acc	720
Leu Leu Glu Asn Pro Val Ala Thr Leu Pro His Tyr Ile Gln Phe Thr	
225 230 235 240	
att ttt cac ctt cgc tca ttg gaa agt ttg gaa ggt cag cca gta act	768
Ile Phe His Leu Arg Ser Leu Glu Ser Leu Glu Gly Gln Pro Val Thr	
245 250 255	
agt cag gac aga caa gaa gct ttt gcg aga ttc agt tta gat gag gta	816
Ser Gln Asp Arg Gln Glu Ala Phe Ala Arg Phe Ser Leu Asp Glu Val	
260 265 270	
gaa aga ctg gaa aga gac ctg gag aag aag aca atg gaa act gaa gag	864
Glu Arg Leu Glu Arg Asp Leu Glu Lys Lys Thr Met Glu Thr Glu Glu	
275 280 285	
ctt agg agt gag cag aca agg ttc ctt gag gaa att aaa agt cag gat	912
Leu Arg Ser Glu Gln Thr Arg Phe Leu Glu Glu Ile Lys Ser Gln Asp	
290 295 300	

ES 2 605 646 T3

aaa ttg aac aaa tca ctg aaa gag gag gcc aga cta caa aaa cag agc	960
Lys Leu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Glu Ala Arg Leu Gln Lys Gln Ser	
305 310 315 320	
tat gag gag ctg gag agt aac cta aac acc aaa aat gaa ttg cta aaa	1008
Tyr Glu Glu Leu Glu Ser Asn Leu Asn Thr Lys Asn Glu Leu Leu Lys	
325 330 335	
cag aag acc atg gaa cta atg cga gca tgt cag aaa cag tat gag atg	1056
Gln Lys Thr Met Glu Leu Met Arg Ala Cys Gln Lys Gln Tyr Glu Met	
340 345 350	
gaa cag gag ttg gcc ttt tat aaa att gat gcc aaa ttt gaa cca cta	1104
Glu Gln Glu Leu Ala Phe Tyr Lys Ile Asp Ala Lys Phe Glu Pro Leu	
355 360 365	
aat tat tac cca tca gag tat gtc gaa att gat aaa acc cca gat gaa	1152
Asn Tyr Tyr Pro Ser Glu Tyr Val Glu Ile Asp Lys Thr Pro Asp Glu	
370 375 380	
agc cct tac att ggc aaa tcc aga tac aag aga aat atg ttc act aca	1200
Ser Pro Tyr Ile Gly Lys Ser Arg Tyr Lys Arg Asn Met Phe Thr Thr	
385 390 395 400	
gag agt tat att att gca aat gcc cag aca gta aag atc aag aag atg	1248
Glu Ser Tyr Ile Ile Ala Asn Ala Gln Thr Val Lys Ile Lys Lys Met	
405 410 415	
gag cta gat gaa ggg gaa caa ctc aga aat gag cac gtg aac ttg gga	1296
Glu Leu Asp Glu Gly Glu Gln Leu Arg Asn Glu His Val Asn Leu Gly	
420 425 430	
gca tcg cca aca gac ata caa ctg gaa gac aaa gaa aaa aaa ata agt	1344
Ala Ser Pro Thr Asp Ile Gln Leu Glu Asp Lys Glu Lys Lys Ile Ser	
435 440 445	
gca gca caa act cga cta tca gaa cta cat gat gaa ata gaa aag gca	1392
Ala Ala Gln Thr Arg Leu Ser Glu Leu His Asp Glu Ile Glu Lys Ala	
450 455 460	
gaa caa caa att tta aga gcc act gaa gaa ttt aaa caa ctg gaa gaa	1440
Glu Gln Gln Ile Leu Arg Ala Thr Glu Glu Phe Lys Gln Leu Glu Glu	
465 470 475 480	
gct ata caa ctt aaa aaa att tca gaa gcg gag aaa gac ctt ctt ttc	1488
Ala Ile Gln Leu Lys Lys Ile Ser Glu Ala Glu Lys Asp Leu Leu Phe	
485 490 495	
aag cag ttg agt ggt agg ata cag ctt ctc aat aaa tta cgc caa gaa	1536
Lys Gln Leu Ser Gly Arg Ile Gln Leu Leu Asn Lys Leu Arg Gln Glu	
500 505 510	
gct gtg gat cta gaa aca cag atg gaa aag caa agg caa gaa att ggt	1584
Ala Val Asp Leu Glu Thr Gln Met Glu Lys Gln Arg Gln Glu Ile Gly	
515 520 525	
gaa aag cag aat gag atc aag gac ctg gaa ata gtc aca gat agc ctg	1632
Glu Lys Gln Asn Glu Ile Lys Asp Leu Glu Ile Val Thr Asp Ser Leu	
530 535 540	
gat tcc aga gac cca aaa cat tgc cat atg aag gct cag aaa aga ggt	1680

ES 2 605 646 T3

Asp 545	Ser	Arg	Asp	Pro	Lys 550	His	Cys	His	Met	Lys 555	Ala	Gln	Lys	Arg	Gly 560	
aaa	gaa	caa	caa	ctt	gac	att	atg	aac	aag	cag	tac	aaa	cag	ctt	gaa	1728
Lys	Glu	Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Met	Asn	Lys	Gln	Tyr	Lys	Gln	Leu	Glu	
				565					570					575		
agc	cgt	ttg	gat	gag	ata	ctt	tct	aga	att	gcc	aaa	gaa	act	gaa	gag	1776
Ser	Arg	Leu	Asp	Glu	Ile	Leu	Ser	Arg	Ile	Ala	Lys	Glu	Thr	Glu	Glu	
			580					585					590			
att	aag	gac	ctt	gaa	gaa	cag	ctt	act	gaa	gga	caa	ata	gcc	gca	aac	1824
Ile	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	Glu	Gly	Gln	Ile	Ala	Ala	Asn	
		595					600					605				
gaa	gcc	ctg	aag	aag	gac	tta	gaa	agt	gtc	atc	agt	ggg	ttg	caa	gaa	1872
Glu	Ala	Leu	Lys	Lys	Asp	Leu	Glu	Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Glu	
	610					615					620					
tac	ctg	gag	act	gtc	aaa	ggg	cag	gcc	cgt	cag	gcc	cag	aat	gag	tgc	1920
Tyr	Leu	Glu	Thr	Val	Lys	Gly	Gln	Ala	Arg	Gln	Ala	Gln	Asn	Glu	Cys	
	625				630					635					640	
aga	aag	cta	cag	gat	gag	aag	gag	aca	ttg	ctg	cag	aga	ttg	agt	gag	1968
Arg	Lys	Leu	Gln	Asp	Glu	Lys	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Leu	Ser	Glu	
				645					650					655		
gtc	gag	cag	gag	agg	gac	caa	ctg	gaa	ata	gtg	gcc	ata	gat	gca	gaa	2016
Val	Glu	Gln	Glu	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Ile	Val	Ala	Ile	Asp	Ala	Glu	
			660					665					670			
aat	atg	agg	aag	gag	ctc	gca	gaa	ctg	gag	aat	gcc	ctc	cag	gag	cag	2064
Asn	Met	Arg	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Leu	Gln	Glu	Gln	
		675					680						685			
cat	gag	gtg	aat	ata	tct	ctg	cag	cag	acc	cag	gga	gat	ctc	agt	gcc	2112
His	Glu	Val	Asn	Ile	Ser	Leu	Gln	Gln	Thr	Gln	Gly	Asp	Leu	Ser	Ala	
	690					695					700					
tat	gag	gct	gag	cta	gag	gct	cag	ctg	aaa	ata	cgg	gat	gct	gaa	gcc	2160
Tyr	Glu	Ala	Glu	Leu	Glu	Ala	Gln	Leu	Lys	Ile	Arg	Asp	Ala	Glu	Ala	
	705				710					715				720		
aac	cag	ctc	aag	gag	gag	ttg	gaa	aaa	ctt	aga	agg	ttg	agc	cag	tta	2208
Asn	Gln	Leu	Lys	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Leu	Arg	Arg	Leu	Ser	Gln	Leu	
				725					730					735		
gaa	caa	tcg	gcc	ctt	caa	gca	gag	ctt	gag	aag	gaa	aag	caa	gcc	ttc	2256
Glu	Gln	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Gln	Ala	Phe	
			740					745					750			
aag	act	gct	gtc	aaa	aaa	gcc	cag	ctc	tca	gaa	gga	aag	gac	caa	gaa	2304
Lys	Thr	Ala	Val	Lys	Lys	Ala	Gln	Leu	Ser	Glu	Gly	Lys	Asp	Gln	Glu	
		755					760						765			
aat	agt	gag	ctc	cgc	aca	caa	ctc	caa	cag	ctg	cag	gat	gac	aat	gac	2352
Asn	Ser	Glu	Leu	Arg	Thr	Gln	Leu	Gln	Gln	Leu	Gln	Asp	Asp	Asn	Asp	
		770				775						780				
cta	ttg	aaa	cag	caa	ctt	aaa	gat	ttc	cag	agt	cac	ctt	aac	cat	gtg	2400
Leu	Leu	Lys	Gln	Gln	Leu	Lys	Asp	Phe	Gln	Ser	His	Leu	Asn	His	Val	

ES 2 605 646 T3

785		790		795		800	
ggt gat ggt ttg att cgt cca gaa gaa gtg gca gct tgt gtg gat gag							2448
Val Asp Gly Leu Ile Arg Pro Glu Glu Val Ala Ala Cys Val Asp Glu							
		805		810		815	
cta agg aaa aaa ctg aag tca gga gct ggg gaa atg aga atc cat act							2496
Leu Arg Lys Lys Leu Lys Ser Gly Ala Gly Glu Met Arg Ile His Thr							
		820		825		830	
cct tca gat gtc tta ggg aaa agt ctt gct gac ttg cag aag caa ttc							2544
Pro Ser Asp Val Leu Gly Lys Ser Leu Ala Asp Leu Gln Lys Gln Phe							
		835		840		845	
agt gag atc ctg gca cgc tcc cag tgg gaa aga cag gaa gca caa gtg							2592
Ser Glu Ile Leu Ala Arg Ser Gln Trp Glu Arg Gln Glu Ala Gln Val							
		850		855		860	
aga gag aga aaa ctc cag gag gaa atg gct ctg caa caa gag aaa ctg							2640
Arg Glu Arg Lys Leu Gln Glu Glu Met Ala Leu Gln Gln Glu Lys Leu							
		865		870		875	880
gcg agc gga caa gag gag ttc agg cac gcc tgc gag agg gcc ctg gaa							2688
Ala Ser Gly Gln Glu Glu Phe Arg His Ala Cys Glu Arg Ala Leu Glu							
		885		890		895	
gcc cga att agt ttt gat aag agg cag cac gaa gca aga atc cag cag							2736
Ala Arg Ile Ser Phe Asp Lys Arg Gln His Glu Ala Arg Ile Gln Gln							
		900		905		910	
ttg gag aat gaa att cac tat ttg caa gaa aat cta aaa agt atg gag							2784
Leu Glu Asn Glu Ile His Tyr Leu Gln Glu Asn Leu Lys Ser Met Glu							
		915		920		925	
gaa atc caa ggt ctc aca gac ctc caa ctt cag gaa gct gat gaa gag							2832
Glu Ile Gln Gly Leu Thr Asp Leu Gln Leu Gln Glu Ala Asp Glu Glu							
		930		935		940	
aag gag aga att ctg gcc caa ctc cgg gag tta gag aaa aag aag aaa							2880
Lys Glu Arg Ile Leu Ala Gln Leu Arg Glu Leu Glu Lys Lys Lys Lys							
		945		950		955	960
ctt gag gat gcc aag tct cag gag cag ttt ctt gga tta gat aga gaa							2928
Leu Glu Asp Ala Lys Ser Gln Glu Gln Phe Leu Gly Leu Asp Arg Glu							
		965		970		975	
ttg aag aag cta aag aaa gct gtg gct gcc tot gat aag ctg gcc aca							2976
Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Val Ala Ala Ser Asp Lys Leu Ala Thr							
		980		985		990	
gct gag ctc acc att gcc aaa gac cag ctc aag tcc ctt cat gga act							3024
Ala Glu Leu Thr Ile Ala Lys Asp Gln Leu Lys Ser Leu His Gly Thr							
		995		1000		1005	
gtg atg aaa att aac cag gag cga gca gag gag ctg cag gag acg							3069
Val Met Lys Ile Asn Gln Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gln Glu Thr							
		1010		1015		1020	
gag agg ttc agc aga aag gca gca caa gca gct agg gat ctg atc							3114
Glu Arg Phe Ser Arg Lys Ala Ala Gln Ala Ala Arg Asp Leu Ile							
		1025		1030		1035	

ES 2 605 646 T3

cga gca	gaa gcg gag att gaa	ctc ctg cag aag ctt	ctc aga gat	3159
Arg Ala	Glu Ala Glu Ile Glu	Leu Leu Gln Lys Leu	Leu Arg Asp	
1040	1045	1050		
aaa gag	gag cag ttt cga aat	gag att gag aaa gta	gat gtc ggc	3204
Lys Glu	Glu Gln Phe Arg Asn	Glu Ile Glu Lys Val	Asp Val Gly	
1055	1060	1065		
tct gga	gga gca aag tca cag	atg ctg gag atg gag	aaa cta aat	3249
Ser Gly	Gly Ala Lys Ser Gln	Met Leu Glu Met Glu	Lys Leu Asn	
1070	1075	1080		
gag aca	atg gag agg caa aga	aca gag att gct agg	ctg agg aat	3294
Glu Thr	Met Glu Arg Gln Arg	Thr Glu Ile Ala Arg	Leu Arg Asn	
1085	1090	1095		
tta cta	gac ctc acc ggg gct	gat aac aaa gga aac	ttt gaa aat	3339
Leu Leu	Asp Leu Thr Gly Ala	Asp Asn Lys Gly Asn	Phe Glu Asn	
1100	1105	1110		
gtt ttg	gaa gaa att gct gaa	ctt cga cgt gaa gtt	tct cat cag	3384
Val Leu	Glu Glu Ile Ala Glu	Leu Arg Arg Glu Val	Ser His Gln	
1115	1120	1125		
aat gat	tac atc agc agc atg	aca gat cct ttc aaa	aga cga ggc	3429
Asn Asp	Tyr Ile Ser Ser Met	Thr Asp Pro Phe Lys	Arg Arg Gly	
1130	1135	1140		
tat tgg	tac ttt atg cca cca	cca tca tca tca aaa	gtt tcc agc	3474
Tyr Trp	Tyr Phe Met Pro Pro	Pro Ser Ser Ser Lys	Val Ser Ser	
1145	1150	1155		
cac agt	tcc cag gcc acc aag	gac tct ggt gtt ggc	cta aag tac	3519
His Ser	Ser Gln Ala Thr Lys	Asp Ser Gly Val Gly	Leu Lys Tyr	
1160	1165	1170		
aca gcc	tcc act ccg gtt aga	aaa cca cat cgt gga	cgg cag gat	3564
Thr Ala	Ser Thr Pro Val Arg	Lys Pro His Arg Gly	Arg Gln Asp	
1175	1180	1185		
gga aag	gag aac agt ggg cct	cca cct gcc tca gga	tac tgg gtg	3609
Gly Lys	Glu Asn Ser Gly Pro	Pro Pro Ala Ser Gly	Tyr Trp Val	
1190	1195	1200		
tat tct	cct atc agg agt ggg	tta cat aaa tcg ttc	tca aat aga	3654
Tyr Ser	Pro Ile Arg Ser Gly	Leu His Lys Ser Phe	Ser Asn Arg	
1205	1210	1215		
gac gca	gac agt gga gga gat	agc cag gaa gag agc	gag cta gat	3699
Asp Ala	Asp Ser Gly Gly Asp	Ser Gln Glu Glu Ser	Glu Leu Asp	
1220	1225	1230		
gac caa	gaa gac cac cca ttt	gta cct cct cct gga	tac atg atg	3744
Asp Gln	Glu Asp His Pro Phe	Val Pro Pro Pro Gly	Tyr Met Met	
1235	1240	1245		
tac act	gtg ttt cct gat ggt	tct cct gta ccc cag	ggc atg gcc	3789
Tyr Thr	Val Phe Pro Asp Gly	Ser Pro Val Pro Gln	Gly Met Ala	
1250	1255	1260		

ES 2 605 646 T3

ctg tat gca ccc cct cct ccc ttg ccc aac aat agc cag cct ctt	3834
Leu Tyr Ala Pro Pro Pro Pro Leu Pro Asn Asn Ser Gln Pro Leu	
1265 1270 1275	
gac ctt ggc act gtt gtt tat ggc cca cct cct gtt ggg gct ccc	3879
Asp Leu Gly Thr Val Val Tyr Gly Pro Pro Pro Val Gly Ala Pro	
1280 1285 1290	
atc gtg tat ggg cct cca cct ccc aac ttc tcc gta ccc ctc atc	3924
Ile Val Tyr Gly Pro Pro Pro Pro Asn Phe Ser Val Pro Leu Ile	
1295 1300 1305	
ccc gtg ggt gtg ctg cac tgc aat gtc cca gaa cac cat aac ttg	3969
Pro Val Gly Val Leu His Cys Asn Val Pro Glu His His Asn Leu	
1310 1315 1320	
gag aat gaa gtt tct aga tta gaa gac ata atg cag cat tta aaa	4014
Glu Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ile Met Gln His Leu Lys	
1325 1330 1335	
tct ggg aaa cgg gaa cag tgc atg aaa aca ccc aag ctg cag tcg	4059
Ser Gly Lys Arg Glu Gln Cys Met Lys Thr Pro Lys Leu Gln Ser	
1340 1345 1350	
gag aaa gaa ctc gca gag ctg cag cat aac att gat ggt ctt ttg	4104
Glu Lys Glu Leu Ala Glu Leu Gln His Asn Ile Asp Gly Leu Leu	
1355 1360 1365	
caa gag aag aaa gac tta gag cat gaa gta gaa gaa tta cat aga	4149
Gln Glu Lys Lys Asp Leu Glu His Glu Val Glu Glu Leu His Arg	
1370 1375 1380	
acc atc caa aaa cat caa cag cga aaa gat ttc att gat gga aac	4194
Thr Ile Gln Lys His Gln Gln Arg Lys Asp Phe Ile Asp Gly Asn	
1385 1390 1395	
gtt gag agt ctt gtg aat gat cta gaa ata gag aag tca ctc aaa	4239
Val Glu Ser Leu Val Asn Asp Leu Glu Ile Glu Lys Ser Leu Lys	
1400 1405 1410	
cac cat gaa gat att gtt gat gaa att gaa tgt att gag agg acc	4284
His His Glu Asp Ile Val Asp Glu Ile Glu Cys Ile Glu Arg Thr	
1415 1420 1425	
ctt ctg aag cgc cgt gca gag ctc agg gaa gcc gac cgg ctg ctg	4329
Leu Leu Lys Arg Arg Ala Glu Leu Arg Glu Ala Asp Arg Leu Leu	
1430 1435 1440	
acg gag gct gaa agt gaa ctt tca tgc acg aaa gag aaa aca aaa	4374
Thr Glu Ala Glu Ser Glu Leu Ser Cys Thr Lys Glu Lys Thr Lys	
1445 1450 1455	
cat gct gtt gag aag ttc act gat gcc aag aga aat tta ttg caa	4419
His Ala Val Glu Lys Phe Thr Asp Ala Lys Arg Asn Leu Leu Gln	
1460 1465 1470	
act gag aaa gat gct gag gag tta gaa agg aga gcc cag gaa act	4464
Thr Glu Lys Asp Ala Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ala Gln Glu Thr	
1475 1480 1485	
gcc att aac ctc gtc aaa gcc gac cag cag ctg aga ttg ctc cag	4509

ES 2 605 646 T3

Ala	Ile	Asn	Leu	Val	Lys	Ala	Asp	Gln	Gln	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln			
	1490					1495					1500						
gct	gac	acg	aag	gat	ttg	gag	cag	cac	aaa	atg	gag	caa	gag	gaa			4554
Ala	Asp	Thr	Lys	Asp	Leu	Glu	Gln	His	Lys	Met	Glu	Gln	Glu	Glu			
	1505					1510					1515						
atc	ttg	aaa	gaa	ata	aac	aaa	gtt	gtt	gca	gca	aaa	gac	tca	gac			4599
Ile	Leu	Lys	Glu	Ile	Asn	Lys	Val	Val	Ala	Ala	Lys	Asp	Ser	Asp			
	1520					1525					1530						
ttc	cag	agc	cta	aac	aag	aag	aag	gaa	gta	ctg	aca	gga	gag	ctg			4644
Phe	Gln	Ser	Leu	Asn	Lys	Lys	Lys	Glu	Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Leu			
	1535					1540					1545						
cag	aaa	ctc	cag	aag	gac	att	gag	act	gca	cgg	cac	aat	gag	gat			4689
Gln	Lys	Leu	Gln	Lys	Asp	Ile	Glu	Thr	Ala	Arg	His	Asn	Glu	Asp			
	1550					1555					1560						
cag	cac	ctg	cag	gtc	ctt	aaa	gag	tcg	gag	acc	ctc	ctg	cag	gcc			4734
Gln	His	Leu	Gln	Val	Leu	Lys	Glu	Ser	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala			
	1565					1570					1575						
aag	aaa	gct	gag	ctg	gaa	aat	ctg	aaa	agc	cag	gtg	tca	gga	cag			4779
Lys	Lys	Ala	Glu	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Ser	Gln	Val	Ser	Gly	Gln			
	1580					1585					1590						
cag	cag	gag	atg	gcc	gtc	ttg	gac	agg	gag	tta	gga	cac	aag	aag			4824
Gln	Gln	Glu	Met	Ala	Val	Leu	Asp	Arg	Glu	Leu	Gly	His	Lys	Lys			
	1595					1600					1605						
gaa	gag	ctg	cat	ctc	ctc	cag	gaa	agc	atg	gtc	cag	gcc	aaa	gct			4869
Glu	Glu	Leu	His	Leu	Leu	Gln	Glu	Ser	Met	Val	Gln	Ala	Lys	Ala			
	1610					1615					1620						
gac	ctc	cag	gaa	gca	ctg	aga	cta	gga	gaa	agt	gaa	gta	act	gag			4914
Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Gly	Glu	Ser	Glu	Val	Thr	Glu			
	1625					1630					1635						
aag	tgc	aat	cac	att	agg	gaa	gta	aaa	tct	ctt	ctg	gaa	gaa	ctc			4959
Lys	Cys	Asn	His	Ile	Arg	Glu	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Glu	Glu	Leu			
	1640					1645					1650						
agt	ttt	cag	aaa	gga	gaa	ctg	aat	gtc	cag	atc	agt	gaa	aaa	aaa			5004
Ser	Phe	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asn	Val	Gln	Ile	Ser	Glu	Lys	Lys			
	1655					1660					1665						
act	caa	ctt	gca	ctc	ata	aag	cag	gaa	att	gaa	aaa	gag	gaa	gac			5049
Thr	Gln	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Gln	Glu	Ile	Glu	Lys	Glu	Glu	Asp			
	1670					1675					1680						
aat	ctt	cag	gta	gtt	tta	ggg	caa	atg	tct	aaa	cat	aaa	act	gaa			5094
Asn	Leu	Gln	Val	Val	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	Lys	His	Lys	Thr	Glu			
	1685					1690					1695						
cta	aag	aat	att	ctg	gac	atg	ttg	caa	ctt	gaa	aat	aat	gag	ctg			5139
Leu	Lys	Asn	Ile	Leu	Asp	Met	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	Asn	Glu	Leu			
	1700					1705					1710						
caa	ggt	ttg	aag	ctc	caa	cat	gac	caa	aag	atg	tct	gaa	tta	gag			5184
Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	His	Asp	Gln	Lys	Met	Ser	Glu	Leu	Glu			



ES 2 605 646 T3

ctc	cag	aaa	gag	cga	gaa	tgt	gaa	gaa	aaa	aag	tta	gaa	gct	agt	5904
Leu	Gln	Lys	Glu	Arg	Glu	Cys	Glu	Glu	Lys	Lys	Leu	Glu	Ala	Ser	
	1955					1960					1965				
aaa	gtg	act	ctg	aag	gag	cag	cag	caa	cag	ctg	gaa	aag	gaa	ttg	5949
Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Gln	Gln	Gln	Gln	Leu	Glu	Lys	Glu	Leu	
	1970					1975					1980				
atg	gag	cag	aaa	ggc	aag	ctg	gac	cag	gtg	ctc	gct	aag	ctc	ttg	5994
Met	Glu	Gln	Lys	Gly	Lys	Leu	Asp	Gln	Val	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	
	1985					1990					1995				
gtg	gct	gag	gag	cgt	gtc	agg	acc	ttg	cag	gag	gag	gga	agg	tgg	6039
Val	Ala	Glu	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Leu	Gln	Glu	Glu	Gly	Arg	Trp	
	2000					2005					2010				
agc	gag	acc	ctg	gag	aag	acg	ctc	tcc	cag	acc	aag	cga	cag	ctt	6084
Ser	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Arg	Gln	Leu	
	2015					2020					2025				
tca	gaa	cgg	gag	cag	cag	tta	ctg	gcc	aag	tca	gac	gag	ctg	ctg	6129
Ser	Glu	Arg	Glu	Gln	Gln	Leu	Leu	Ala	Lys	Ser	Asp	Glu	Leu	Leu	
	2030					2035					2040				
gcc	ctg	cag	aag	gag	acg	gac	tcc	atg	agg	gcg	gac	ttc	agc	ctc	6174
Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Thr	Asp	Ser	Met	Arg	Ala	Asp	Phe	Ser	Leu	
	2045					2050					2055				
ttg	cgc	aac	cag	ttc	ctg	aca	gaa	aga	aag	aaa	gcc	gag	aag	cag	6219
Leu	Arg	Asn	Gln	Phe	Leu	Thr	Glu	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Gln	
	2060					2065					2070				
gtg	gcc	agc	ctg	aag	gaa	gcc	ctt	aag	atc	cag	cgg	agc	caa	ctg	6264
Val	Ala	Ser	Leu	Lys	Glu	Ala	Leu	Lys	Ile	Gln	Arg	Ser	Gln	Leu	
	2075					2080					2085				
gag	aag	aac	ctt	ctg	gag	caa	aag	cag	gag	aac	agc	tgc	atg	cag	6309
Glu	Lys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gln	Lys	Gln	Glu	Asn	Ser	Cys	Met	Gln	
	2090					2095					2100				
agg	gag	atg	gca	acc	atc	gaa	cag	gtg	gcc	cag	gac	aac	cac	gag	6354
Arg	Glu	Met	Ala	Thr	Ile	Glu	Gln	Val	Ala	Gln	Asp	Asn	His	Glu	
	2105					2110					2115				
cgg	gcc	cgg	cgc	ctg	atg	agg	gag	ctc	aac	cag	atg	cag	cgc	gag	6399
Arg	Ala	Arg	Arg	Leu	Met	Arg	Glu	Leu	Asn	Gln	Met	Gln	Arg	Glu	
	2120					2125					2130				
tac	gtg	gag	ctc	agg	aaa	cag	atg	aca	aac	caa	aag	gat	ttg	gaa	6444
Tyr	Val	Glu	Leu	Arg	Lys	Gln	Met	Thr	Asn	Gln	Lys	Asp	Leu	Glu	
	2135					2140					2145				
aga	aga	cag	atg	gaa	atc	agt	gat	gcg	atg	caa	gca	ctt	aaa	tgt	6489
Arg	Arg	Gln	Met	Glu	Ile	Ser	Asp	Ala	Met	Gln	Ala	Leu	Lys	Cys	
	2150					2155					2160				
gag	gtg	aaa	gat	gaa	atc	cga	acc	agc	ctg	aag	aat	ctc	aac	cag	6534
Glu	Val	Lys	Asp	Glu	Ile	Arg	Thr	Ser	Leu	Lys	Asn	Leu	Asn	Gln	
	2165					2170					2175				

ES 2 605 646 T3

ttt ctt cca gag ctg cca gcg gac ctg gag gcc ctt ctg gaa agg	6579
Phe Leu Pro Glu Leu Pro Ala Asp Leu Glu Ala Leu Leu Glu Arg	
2180 2185 2190	
aat gag aac ctt gga gga gcc ttg gag agc ttg aaa gag aat ttc	6624
Asn Glu Asn Leu Gly Gly Gly Leu Glu Ser Leu Lys Glu Asn Phe	
2195 2200 2205	
ccg ttt acc gtg agc gac aga cca tca tct tgc gaa gag aaa ctg	6669
Pro Phe Thr Val Ser Asp Arg Pro Ser Ser Cys Glu Glu Lys Leu	
2210 2215 2220	
aat ttt ggc cag gct cac gtg gcg gat gaa cag tgg cgg gga gag	6714
Asn Phe Gly Gln Ala His Val Ala Asp Glu Gln Trp Arg Gly Glu	
2225 2230 2235	
gca ctc cgg gag aag ctg cgc cac cgc gag gac cgg ctc aag gcc	6759
Ala Leu Arg Glu Lys Leu Arg His Arg Glu Asp Arg Leu Lys Ala	
2240 2245 2250	
cag ctg cgc cgc tgc atg tcc aag cag gcc gag gtg ctg agc gag	6804
Gln Leu Arg Arg Cys Met Ser Lys Gln Ala Glu Val Leu Ser Glu	
2255 2260 2265	
ggc cgg cgg cgc acg gag ggg acc ctg cac agc ctg cgg cgg cag	6849
Gly Arg Arg Arg Thr Glu Gly Thr Leu His Ser Leu Arg Arg Gln	
2270 2275 2280	
gtg gac gcc ctg ggc gag ctg gtc acc agc act tcc ggg gac tcc	6894
Val Asp Ala Leu Gly Glu Leu Val Thr Ser Thr Ser Gly Asp Ser	
2285 2290 2295	
gcg tcc acc cgc agt ctg tcg cgc acc gag ggc tcg ctc gcc gag	6939
Ala Ser Thr Arg Ser Leu Ser Arg Thr Glu Gly Ser Leu Ala Glu	
2300 2305 2310	
gac gaa cgg cgg ggg ccc agc cag gag ctg cac gtg ctg ggg tcg	6984
Asp Glu Pro Pro Gly Pro Ser Gln Glu Leu His Val Leu Gly Ser	
2315 2320 2325	
ggc ggc agc gac cga ggt gga gga cgg gcc ggg gcc agg aag ggc	7029
Gly Gly Ser Asp Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Arg Lys Gly	
2330 2335 2340	
ctt tcc cga cgc cgc cgc tgg aac cac gga gaa gcg cgc ctc ggc	7074
Leu Ser Arg Arg Arg Arg Trp Asn His Gly Glu Ala Arg Leu Gly	
2345 2350 2355	
ccg cgg agg ccc cca cgg gag ggg gca ggg cgg gcc gcg gcc ttc	7119
Pro Arg Arg Pro Pro Arg Glu Gly Ala Gly Arg Gly Ala Ala Phe	
2360 2365 2370	
cga gcc ttg gtc tcc tgc tcc cgc cct gca gag ctc cgg gcg gct	7164
Arg Ala Leu Val Ser Cys Ser Arg Pro Ala Glu Leu Pro Ala Ala	
2375 2380 2385	
ccc cgg agg ccc gtc gcc gcg gct gga cgc gca cgg acc ctg agg	7209
Pro Pro Arg Pro Val Ala Ala Ala Gly Arg Ala Pro Thr Leu Arg	
2390 2395 2400	
acc cgg agg acc cgg agg ccc ggc gtc ccc tcg gaa cgc ttc ctc	7254

ES 2 605 646 T3

Thr	Arg	Arg	Thr	Arg	Arg	Pro	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Arg	Phe	Leu	
	2405					2410					2415				
cgc	gtc	cgc	gga	cac	cag	gct	cac	ggg	aag	gcg	cgt	cca	tgc	ggg	7299
Arg	Val	Arg	Gly	His	Gln	Ala	His	Gly	Lys	Ala	Arg	Pro	Cys	Gly	
	2420					2425					2430				
aag	agc	cgc	gag	cgg	aac	ccg	gat	gcc	cgg	gct	ggt	ctc	tgg	gcc	7344
Lys	Ser	Arg	Glu	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Arg	Ala	Gly	Leu	Trp	Ala	
	2435					2440					2445				
ttg	gaa	acg	tgt	tgc	cgt	aaa	agc	agc	gcc	cgc	ggc	tgc	gga	ctt	7389
Leu	Glu	Thr	Cys	Cys	Arg	Lys	Ser	Ser	Ala	Arg	Gly	Cys	Gly	Leu	
	2450					2455					2460				
gaa	gcc	ccg	aac	tgc	cgc	cgt	gcc	cgg	tgc	gga	gcg	agc	gtg	cgg	7434
Glu	Ala	Pro	Asn	Cys	Arg	Arg	Ala	Arg	Cys	Gly	Ala	Ser	Val	Arg	
	2465					2470					2475				
tac	cct	ctc	gtg	cct	cgg	ggc	cgg	act	gga	cga	ggg	gcc	gtg	acc	7479
Tyr	Pro	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Ala	Val	Thr	
	2480					2485					2490				
ccg	tgg	ggc	cgc	ctg	cag	tcc	cga	ggg	acg	cgg	acc	acc	ccc	cgg	7524
Pro	Trp	Gly	Arg	Leu	Gln	Ser	Arg	Gly	Thr	Arg	Thr	Thr	Pro	Arg	
	2495					2500					2505				
ccg	gtg	cga	cgg	gag	cat	ccc	cag	cac	cag	gaa	agg	ccc	cca	ggg	7569
Pro	Val	Arg	Arg	Glu	His	Pro	Gln	His	Gln	Glu	Arg	Pro	Pro	Gly	
	2510					2515					2520				
cgc	gtt	acc	gcg	gcc	cac	act	gag	acc	gcc	cct	ccc	cgc	cgg	gtg	7614
Arg	Val	Thr	Ala	Ala	His	Thr	Glu	Thr	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	Val	
	2525					2530					2535				
ttc	cac	gcg	cga	gta	gca	gtc	ggg	gag	gtc	agc	ctc	ggg	ccc	ggc	7659
Phe	His	Ala	Arg	Val	Ala	Val	Gly	Glu	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Gly	
	2540					2545					2550				
cgc	ggt	ctc	gag	cga	aca	cgg	ggc	ggg	ggc	ggg	ggg	gcg	ggg	gcg	7704
Arg	Gly	Leu	Glu	Arg	Thr	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	
	2555					2560					2565				
gga	ctc	ctc	gca	gag	gcc	gcg	gcc	acg	gcc	cgg	tgc	gca	gac	ccc	7749
Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Arg	Cys	Ala	Asp	Pro	
	2570					2575					2580				
tcc	aca	gac	ccc	tcc	gca	tag									7770
Ser	Thr	Asp	Pro	Ser	Ala										
	2585														

<210> 42  
 <211> 2589  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 42



ES 2 605 646 T3

Ser Ser His Ser Pro Ser Pro Pro Ser Leu Thr Ser Asn Met Arg Ser  
 20 25 30

Arg Ser Leu Ser Pro Leu Ser Gly Ser Glu Thr Leu Pro Phe His Phe  
 35 40 45

Gly Gly Pro Trp His Glu Gln Val Glu Ile Thr Asp Glu Ser Thr Val  
 50 55 60

Val Leu Asp Tyr Gln Asp His Lys Glu Ala Asp Ser His Ala Gly Val  
 65 70 75 80

Arg Tyr Ile Thr Glu Ala Leu Val Arg Lys Leu Thr Lys Gln Asp Asn  
 85 90 95

Leu Ala Leu Val Lys Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ala Lys Gly Gly Gly  
 100 105 110

Lys Lys Phe Arg Cys Ile Glu Asn Leu Glu Lys Cys Val Lys Leu Glu  
 115 120 125

Val Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Leu Ile Gly Lys Ile Glu Lys Val Asp  
 130 135 140

Lys Leu Leu Lys Leu Arg Glu Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Lys Ile Arg  
 145 150 155 160

Lys Ile Glu Gly Ile Glu Asn Leu Tyr Asn Leu Gln Lys Leu Asn Leu  
 165 170 175

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

Lys Ser Leu Arg Ile Leu Asn Leu Lys Gly Asn Lys Ile Ser Ser Leu  
 195 200 205

Gln Asp Val Ser Lys Leu Lys Pro Leu Gln Asp Leu Thr Ser Leu Ile  
 210 215 220

Leu Leu Glu Asn Pro Val Ala Thr Leu Pro His Tyr Ile Gln Phe Thr  
 225 230 235 240

Ile Phe His Leu Arg Ser Leu Glu Ser Leu Glu Gly Gln Pro Val Thr  
 245 250 255

ES 2 605 646 T3

Ser Gln Asp Arg Gln Glu Ala Phe Ala Arg Phe Ser Leu Asp Glu Val  
 260 265 270

Glu Arg Leu Glu Arg Asp Leu Glu Lys Lys Thr Met Glu Thr Glu Glu  
 275 280 285

Leu Arg Ser Glu Gln Thr Arg Phe Leu Glu Glu Ile Lys Ser Gln Asp  
 290 295 300

Lys Leu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Glu Ala Arg Leu Gln Lys Gln Ser  
 305 310 315 320

Tyr Glu Glu Leu Glu Ser Asn Leu Asn Thr Lys Asn Glu Leu Leu Lys  
 325 330 335

Gln Lys Thr Met Glu Leu Met Arg Ala Cys Gln Lys Gln Tyr Glu Met  
 340 345 350

Glu Gln Glu Leu Ala Phe Tyr Lys Ile Asp Ala Lys Phe Glu Pro Leu  
 355 360 365

Asn Tyr Tyr Pro Ser Glu Tyr Val Glu Ile Asp Lys Thr Pro Asp Glu  
 370 375 380

Ser Pro Tyr Ile Gly Lys Ser Arg Tyr Lys Arg Asn Met Phe Thr Thr  
 385 390 395 400

Glu Ser Tyr Ile Ile Ala Asn Ala Gln Thr Val Lys Ile Lys Lys Met  
 405 410 415

Glu Leu Asp Glu Gly Glu Gln Leu Arg Asn Glu His Val Asn Leu Gly  
 420 425 430

Ala Ser Pro Thr Asp Ile Gln Leu Glu Asp Lys Glu Lys Lys Ile Ser  
 435 440 445

Ala Ala Gln Thr Arg Leu Ser Glu Leu His Asp Glu Ile Glu Lys Ala  
 450 455 460

Glu Gln Gln Ile Leu Arg Ala Thr Glu Glu Phe Lys Gln Leu Glu Glu  
 465 470 475 480

Ala Ile Gln Leu Lys Lys Ile Ser Glu Ala Glu Lys Asp Leu Leu Phe  
 485 490 495

ES 2 605 646 T3

Lys Gln Leu Ser Gly Arg Ile Gln Leu Leu Asn Lys Leu Arg Gln Glu  
 500 505 510  
 Ala Val Asp Leu Glu Thr Gln Met Glu Lys Gln Arg Gln Glu Ile Gly  
 515 520 525  
 Glu Lys Gln Asn Glu Ile Lys Asp Leu Glu Ile Val Thr Asp Ser Leu  
 530 535 540  
 Asp Ser Arg Asp Pro Lys His Cys His Met Lys Ala Gln Lys Arg Gly  
 545 550 555 560  
 Lys Glu Gln Gln Leu Asp Ile Met Asn Lys Gln Tyr Lys Gln Leu Glu  
 565 570 575  
 Ser Arg Leu Asp Glu Ile Leu Ser Arg Ile Ala Lys Glu Thr Glu Glu  
 580 585 590  
 Ile Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Thr Glu Gly Gln Ile Ala Ala Asn  
 595 600 605  
 Glu Ala Leu Lys Lys Asp Leu Glu Ser Val Ile Ser Gly Leu Gln Glu  
 610 615 620  
 Tyr Leu Glu Thr Val Lys Gly Gln Ala Arg Gln Ala Gln Asn Glu Cys  
 625 630 635 640  
 Arg Lys Leu Gln Asp Glu Lys Glu Thr Leu Leu Gln Arg Leu Ser Glu  
 645 650 655  
 Val Glu Gln Glu Arg Asp Gln Leu Glu Ile Val Ala Ile Asp Ala Glu  
 660 665 670  
 Asn Met Arg Lys Glu Leu Ala Glu Leu Glu Asn Ala Leu Gln Glu Gln  
 675 680 685  
 His Glu Val Asn Ile Ser Leu Gln Gln Thr Gln Gly Asp Leu Ser Ala  
 690 695 700  
 Tyr Glu Ala Glu Leu Glu Ala Gln Leu Lys Ile Arg Asp Ala Glu Ala  
 705 710 715 720  
 Asn Gln Leu Lys Glu Glu Leu Glu Lys Leu Arg Arg Leu Ser Gln Leu  
 725 730 735  
 Glu Gln Ser Ala Leu Gln Ala Glu Leu Glu Lys Glu Lys Gln Ala Phe



ES 2 605 646 T3

Ala Glu Leu Thr Ile Ala Lys Asp Gln Leu Lys Ser Leu His Gly Th  
 995 1000 1005

Val Met Lys Ile Asn Gln Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gln Glu Thr  
 1010 1015 1020

Glu Arg Phe Ser Arg Lys Ala Ala Gln Ala Ala Arg Asp Leu Ile  
 1025 1030 1035

Arg Ala Glu Ala Glu Ile Glu Leu Leu Gln Lys Leu Leu Arg Asp  
 1040 1045 1050

Lys Glu Glu Gln Phe Arg Asn Glu Ile Glu Lys Val Asp Val Gly  
 1055 1060 1065

Ser Gly Gly Ala Lys Ser Gln Met Leu Glu Met Glu Lys Leu Asn  
 1070 1075 1080

Glu Thr Met Glu Arg Gln Arg Thr Glu Ile Ala Arg Leu Arg Asn  
 1085 1090 1095

Leu Leu Asp Leu Thr Gly Ala Asp Asn Lys Gly Asn Phe Glu Asn  
 1100 1105 1110

Val Leu Glu Glu Ile Ala Glu Leu Arg Arg Glu Val Ser His Gln  
 1115 1120 1125

Asn Asp Tyr Ile Ser Ser Met Thr Asp Pro Phe Lys Arg Arg Gly  
 1130 1135 1140

Tyr Trp Tyr Phe Met Pro Pro Pro Ser Ser Ser Lys Val Ser Ser  
 1145 1150 1155

His Ser Ser Gln Ala Thr Lys Asp Ser Gly Val Gly Leu Lys Tyr  
 1160 1165 1170

Thr Ala Ser Thr Pro Val Arg Lys Pro His Arg Gly Arg Gln Asp  
 1175 1180 1185

Gly Lys Glu Asn Ser Gly Pro Pro Pro Ala Ser Gly Tyr Trp Val  
 1190 1195 1200

Tyr Ser Pro Ile Arg Ser Gly Leu His Lys Ser Phe Ser Asn Arg  
 1205 1210 1215

ES 2 605 646 T3

Asp Ala Asp Ser Gly Gly Asp Ser Gln Glu Glu Ser Glu Leu Asp  
 1220 1225 1230

Asp Gln Glu Asp His Pro Phe Val Pro Pro Pro Gly Tyr Met Met  
 1235 1240 1245

Tyr Thr Val Phe Pro Asp Gly Ser Pro Val Pro Gln Gly Met Ala  
 1250 1255 1260

Leu Tyr Ala Pro Pro Pro Pro Leu Pro Asn Asn Ser Gln Pro Leu  
 1265 1270 1275

Asp Leu Gly Thr Val Val Tyr Gly Pro Pro Pro Val Gly Ala Pro  
 1280 1285 1290

Ile Val Tyr Gly Pro Pro Pro Pro Asn Phe Ser Val Pro Leu Ile  
 1295 1300 1305

Pro Val Gly Val Leu His Cys Asn Val Pro Glu His His Asn Leu  
 1310 1315 1320

Glu Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ile Met Gln His Leu Lys  
 1325 1330 1335

Ser Gly Lys Arg Glu Gln Cys Met Lys Thr Pro Lys Leu Gln Ser  
 1340 1345 1350

Glu Lys Glu Leu Ala Glu Leu Gln His Asn Ile Asp Gly Leu Leu  
 1355 1360 1365

Gln Glu Lys Lys Asp Leu Glu His Glu Val Glu Glu Leu His Arg  
 1370 1375 1380

Thr Ile Gln Lys His Gln Gln Arg Lys Asp Phe Ile Asp Gly Asn  
 1385 1390 1395

Val Glu Ser Leu Val Asn Asp Leu Glu Ile Glu Lys Ser Leu Lys  
 1400 1405 1410

His His Glu Asp Ile Val Asp Glu Ile Glu Cys Ile Glu Arg Thr  
 1415 1420 1425

Leu Leu Lys Arg Arg Ala Glu Leu Arg Glu Ala Asp Arg Leu Leu  
 1430 1435 1440

ES 2 605 646 T3

Thr Glu Ala Glu Ser Glu Leu Ser Cys Thr Lys Glu Lys Thr Lys  
1445 1450 1455

His Ala Val Glu Lys Phe Thr Asp Ala Lys Arg Asn Leu Leu Gln  
1460 1465 1470

Thr Glu Lys Asp Ala Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ala Gln Glu Thr  
1475 1480 1485

Ala Ile Asn Leu Val Lys Ala Asp Gln Gln Leu Arg Leu Leu Gln  
1490 1495 1500

Ala Asp Thr Lys Asp Leu Glu Gln His Lys Met Glu Gln Glu Glu  
1505 1510 1515

Ile Leu Lys Glu Ile Asn Lys Val Val Ala Ala Lys Asp Ser Asp  
1520 1525 1530

Phe Gln Ser Leu Asn Lys Lys Lys Glu Val Leu Thr Gly Glu Leu  
1535 1540 1545

Gln Lys Leu Gln Lys Asp Ile Glu Thr Ala Arg His Asn Glu Asp  
1550 1555 1560

Gln His Leu Gln Val Leu Lys Glu Ser Glu Thr Leu Leu Gln Ala  
1565 1570 1575

Lys Lys Ala Glu Leu Glu Asn Leu Lys Ser Gln Val Ser Gly Gln  
1580 1585 1590

Gln Gln Glu Met Ala Val Leu Asp Arg Glu Leu Gly His Lys Lys  
1595 1600 1605

Glu Glu Leu His Leu Leu Gln Glu Ser Met Val Gln Ala Lys Ala  
1610 1615 1620

Asp Leu Gln Glu Ala Leu Arg Leu Gly Glu Ser Glu Val Thr Glu  
1625 1630 1635

Lys Cys Asn His Ile Arg Glu Val Lys Ser Leu Leu Glu Glu Leu  
1640 1645 1650

Ser Phe Gln Lys Gly Glu Leu Asn Val Gln Ile Ser Glu Lys Lys  
1655 1660 1665

Thr Gln Leu Ala Leu Ile Lys Gln Glu Ile Glu Lys Glu Glu Asp

ES 2 605 646 T3

1670						1675						1680			
Asn	Leu	Gln	Val	Val	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	Lys	His	Lys	Thr	Glu	
1685						1690					1695				
Leu	Lys	Asn	Ile	Leu	Asp	Met	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	Asn	Glu	Leu	
1700						1705					1710				
Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	His	Asp	Gln	Lys	Met	Ser	Glu	Leu	Glu	
1715						1720					1725				
Lys	Thr	Arg	Val	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Leu	Glu	Ser	
1730						1735					1740				
Leu	Gln	Gln	Ala	Ala	Leu	Arg	Gln	Arg	Gly	Glu	Ile	Glu	Trp	Gln	
1745						1750					1755				
Lys	Gln	Leu	Leu	Gln	Arg	Asn	Thr	Gln	Glu	Val	Glu	Arg	Met	Thr	
1760						1765					1770				
Ala	Glu	Thr	Arg	Ala	Leu	Gln	Ser	Cys	Val	Glu	Ser	Leu	Cys	Lys	
1775						1780					1785				
Glu	Lys	Gln	Asp	Leu	Glu	Glu	Lys	Gln	Asp	Ser	Trp	Glu	Lys	Lys	
1790						1795					1800				
Leu	Ala	Gln	Thr	Lys	Arg	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Glu	Asp	Ser	
1805						1810					1815				
Glu	Met	Glu	Arg	Ala	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Leu	Asp	Ala	Arg	
1820						1825					1830				
Lys	Leu	Gln	Gln	Glu	Leu	Asp	Gln	Arg	Asn	Arg	Glu	Lys	Leu	Ser	
1835						1840					1845				
Leu	His	Gln	Asp	Leu	Ala	Val	Val	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Glu	Lys	
1850						1855					1860				
Gln	Glu	Ala	Val	Asn	Ser	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Asp	Val	Gln	
1865						1870					1875				
Glu	His	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Val	Leu	Cys	Thr	Thr	Lys	
1880						1885					1890				
Arg	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu	Lys	Asp	
1895						1900					1905				

ES 2 605 646 T3

Val Gly Glu Trp Thr Lys Lys Phe Glu Asp Cys Gln Lys Glu Gly  
 1910 1915 1920

Glu Thr Lys Gln Gln Gln Leu Gln Gly Leu Gln Lys Glu Ile Glu  
 1925 1930 1935

Gly Asn Glu Ala Lys Leu Ala Gln Gln Glu Met Met Phe Gln Arg  
 1940 1945 1950

Leu Gln Lys Glu Arg Glu Cys Glu Glu Lys Lys Leu Glu Ala Ser  
 1955 1960 1965

Lys Val Thr Leu Lys Glu Gln Gln Gln Leu Glu Lys Glu Leu  
 1970 1975 1980

Met Glu Gln Lys Gly Lys Leu Asp Gln Val Leu Ala Lys Leu Leu  
 1985 1990 1995

Val Ala Glu Glu Arg Val Arg Thr Leu Gln Glu Glu Gly Arg Trp  
 2000 2005 2010

Ser Glu Thr Leu Glu Lys Thr Leu Ser Gln Thr Lys Arg Gln Leu  
 2015 2020 2025

Ser Glu Arg Glu Gln Gln Leu Leu Ala Lys Ser Asp Glu Leu Leu  
 2030 2035 2040

Ala Leu Gln Lys Glu Thr Asp Ser Met Arg Ala Asp Phe Ser Leu  
 2045 2050 2055

Leu Arg Asn Gln Phe Leu Thr Glu Arg Lys Lys Ala Glu Lys Gln  
 2060 2065 2070

Val Ala Ser Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Gln Arg Ser Gln Leu  
 2075 2080 2085

Glu Lys Asn Leu Leu Glu Gln Lys Gln Glu Asn Ser Cys Met Gln  
 2090 2095 2100

Arg Glu Met Ala Thr Ile Glu Gln Val Ala Gln Asp Asn His Glu  
 2105 2110 2115

Arg Ala Arg Arg Leu Met Arg Glu Leu Asn Gln Met Gln Arg Glu  
 2120 2125 2130

ES 2 605 646 T3

Tyr Val Glu Leu Arg Lys Gln Met Thr Asn Gln Lys Asp Leu Glu  
 2135 2140 2145  
 Arg Arg Gln Met Glu Ile Ser Asp Ala Met Gln Ala Leu Lys Cys  
 2150 2155 2160  
 Glu Val Lys Asp Glu Ile Arg Thr Ser Leu Lys Asn Leu Asn Gln  
 2165 2170 2175  
 Phe Leu Pro Glu Leu Pro Ala Asp Leu Glu Ala Leu Leu Glu Arg  
 2180 2185 2190  
 Asn Glu Asn Leu Gly Gly Gly Leu Glu Ser Leu Lys Glu Asn Phe  
 2195 2200 2205  
 Pro Phe Thr Val Ser Asp Arg Pro Ser Ser Cys Glu Glu Lys Leu  
 2210 2215 2220  
 Asn Phe Gly Gln Ala His Val Ala Asp Glu Gln Trp Arg Gly Glu  
 2225 2230 2235  
 Ala Leu Arg Glu Lys Leu Arg His Arg Glu Asp Arg Leu Lys Ala  
 2240 2245 2250  
 Gln Leu Arg Arg Cys Met Ser Lys Gln Ala Glu Val Leu Ser Glu  
 2255 2260 2265  
 Gly Arg Arg Arg Thr Glu Gly Thr Leu His Ser Leu Arg Arg Gln  
 2270 2275 2280  
 Val Asp Ala Leu Gly Glu Leu Val Thr Ser Thr Ser Gly Asp Ser  
 2285 2290 2295  
 Ala Ser Thr Arg Ser Leu Ser Arg Thr Glu Gly Ser Leu Ala Glu  
 2300 2305 2310  
 Asp Glu Pro Pro Gly Pro Ser Gln Glu Leu His Val Leu Gly Ser  
 2315 2320 2325  
 Gly Gly Ser Asp Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Arg Lys Gly  
 2330 2335 2340  
 Leu Ser Arg Arg Arg Arg Trp Asn His Gly Glu Ala Arg Leu Gly  
 2345 2350 2355

ES 2 605 646 T3

Pro Arg Arg Pro Pro Arg Glu Gly Ala Gly Arg Gly Ala Ala Phe  
 2360 2365 2370

Arg Ala Leu Val Ser Cys Ser Arg Pro Ala Glu Leu Pro Ala Ala  
 2375 2380 2385

Pro Pro Arg Pro Val Ala Ala Ala Gly Arg Ala Pro Thr Leu Arg  
 2390 2395 2400

Thr Arg Arg Thr Arg Arg Pro Gly Val Pro Ser Glu Arg Phe Leu  
 2405 2410 2415

Arg Val Arg Gly His Gln Ala His Gly Lys Ala Arg Pro Cys Gly  
 2420 2425 2430

Lys Ser Arg Glu Arg Asn Pro Asp Ala Arg Ala Gly Leu Trp Ala  
 2435 2440 2445

Leu Glu Thr Cys Cys Arg Lys Ser Ser Ala Arg Gly Cys Gly Leu  
 2450 2455 2460

Glu Ala Pro Asn Cys Arg Arg Ala Arg Cys Gly Ala Ser Val Arg  
 2465 2470 2475

Tyr Pro Leu Val Pro Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Ala Val Thr  
 2480 2485 2490

Pro Trp Gly Arg Leu Gln Ser Arg Gly Thr Arg Thr Thr Pro Arg  
 2495 2500 2505

Pro Val Arg Arg Glu His Pro Gln His Gln Glu Arg Pro Pro Gly  
 2510 2515 2520

Arg Val Thr Ala Ala His Thr Glu Thr Ala Pro Pro Arg Arg Val  
 2525 2530 2535

Phe His Ala Arg Val Ala Val Gly Glu Val Ser Leu Gly Pro Gly  
 2540 2545 2550

Arg Gly Leu Glu Arg Thr Arg Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala  
 2555 2560 2565

Gly Leu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Thr Ala Arg Cys Ala Asp Pro  
 2570 2575 2580

Ser Thr Asp Pro Ser Ala

ES 2 605 646 T3

2585

5 <210> 43  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 10  
 <400> 43  
 gtcgacctat gcggaggggt ctg 23  
  
 15 <210> 44  
 <211> 6046  
 <212> ADN  
 <213> *Canis familiaris*  
  
 20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(5934)  
 <223>  
  
 25 <400> 44  
  
 atg tcg tcc tgg ctc ggg ggc ctg ggc tcc ggc ctg ggc cag tcg ctg 48  
 Met Ser Ser Trp Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Leu Gly Gln Ser Leu  
 1 5 10 15  
  
 ggg caa gtc gga ggc agc ctg gcc tcc ctc act ggc cag att tca aac 96  
 Gly Gln Val Gly Gly Ser Leu Ala Ser Leu Thr Gly Gln Ile Ser Asn  
 20 25 30  
  
 ttt acg aag gac atg ctg atg gag ggc acg gag gag gtg gaa gca gaa 144  
 Phe Thr Lys Asp Met Leu Met Glu Gly Thr Glu Glu Val Glu Ala Glu  
 35 40 45  
  
 tta cct aat tct agg aga aag gaa gtt gaa gcc att cat gca atc tta 192  
 Leu Pro Asn Ser Arg Arg Lys Glu Val Glu Ala Ile His Ala Ile Leu  
 50 55 60  
  
 aga tca gag aat gag aga ctc aaa gaa ctt tgt act gat tta gaa gag 240  
 Arg Ser Glu Asn Glu Arg Leu Lys Glu Leu Cys Thr Asp Leu Glu Glu  
 65 70 75 80  
  
 aag cat gaa gca tca gag ctt caa ata aag caa caa tct aca aat tac 288  
 Lys His Glu Ala Ser Glu Leu Gln Ile Lys Gln Gln Ser Thr Asn Tyr  
 85 90 95  
  
 cga aat caa cta caa cag aaa gag gta gaa atc agc cat ctt aaa gca 336  
 Arg Asn Gln Leu Gln Gln Lys Glu Val Glu Ile Ser His Leu Lys Ala  
 100 105 110  
  
 aga cag att gca ctg cag gat cag ttg ctg aag ctg cag tca gct gct 384  
 Arg Gln Ile Ala Leu Gln Asp Gln Leu Leu Lys Leu Gln Ser Ala Ala  
 115 120 125  
  
 cag tct gca cat tca gga got agc agc gta cca gca gcc ctg gca tca 432  
 Gln Ser Ala His Ser Gly Ala Ser Ser Val Pro Ala Ala Leu Ala Ser  
 130 135 140

ES 2 605 646 T3

tct ccg ttc agc tat tct gtc agt cat cat gct tca gct ttc cat gac	480
Ser Pro Phe Ser Tyr Ser Val Ser His His Ala Ser Ala Phe His Asp	
145 150 155 160	
gat gac atg gac ttc agt gac ata att tca tca caa caa gaa ata aac	528
Asp Asp Met Asp Phe Ser Asp Ile Ile Ser Ser Gln Gln Glu Ile Asn	
165 170 175	
aga tta tca aat gaa gtt tca aga ctt gag tct gag gtt ggc cat tgg	576
Arg Leu Ser Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Ser Glu Val Gly His Trp	
180 185 190	
agg cat att gct cag act tct aaa gca caa gga tca aat agc tct gat	624
Arg His Ile Ala Gln Thr Ser Lys Ala Gln Gly Ser Asn Ser Ser Asp	
195 200 205	
caa agt gaa atc tgt aaa cta caa agt atc att aag gaa ctc aaa cag	672
Gln Ser Glu Ile Cys Lys Leu Gln Ser Ile Ile Lys Glu Leu Lys Gln	
210 215 220	
att cga agt cag gaa atc gat gac cat caa cat gaa atg tca gtg ttg	720
Ile Arg Ser Gln Glu Ile Asp Asp His Gln His Glu Met Ser Val Leu	
225 230 235 240	
cag aat gca cat caa cag aag ttg aca gat ata agt cgt cgg cat cga	768
Gln Asn Ala His Gln Gln Lys Leu Thr Asp Ile Ser Arg Arg His Arg	
245 250 255	
gaa gaa tta cgt gac tat gaa gaa cga att gaa gaa ctg gaa aat ctg	816
Glu Glu Leu Arg Asp Tyr Glu Glu Arg Ile Glu Glu Leu Glu Asn Leu	
260 265 270	
tta gaa caa ggt ggc tca gga att gta ata cct gat cac tca aaa atc	864
Leu Glu Gln Gly Gly Ser Gly Ile Val Ile Pro Asp His Ser Lys Ile	
275 280 285	
cat gag atg caa aaa act att cag aat cta caa act gaa aaa gta gca	912
His Glu Met Gln Lys Thr Ile Gln Asn Leu Gln Thr Glu Lys Val Ala	
290 295 300	
tct ata aaa aaa att gaa gaa ctt gag gat aaa ata aaa gac ata gat	960
Ser Ile Lys Lys Ile Glu Glu Leu Glu Asp Lys Ile Lys Asp Ile Asp	
305 310 315 320	
aaa aaa ttg tct tct gca gaa aat gac aga gat gtt ttg agg aag gag	1008
Lys Lys Leu Ser Ser Ala Glu Asn Asp Arg Asp Val Leu Arg Lys Glu	
325 330 335	
aaa gaa tgc cta aat gtt gaa aac aga caa ata aca gaa caa tgt gaa	1056
Lys Glu Cys Leu Asn Val Glu Asn Arg Gln Ile Thr Glu Gln Cys Glu	
340 345 350	
agc ttg aaa ctg gaa tgt aaa ttg cag cat gat gct gag aag caa ggt	1104
Ser Leu Lys Leu Glu Cys Lys Leu Gln His Asp Ala Glu Lys Gln Gly	
355 360 365	
gat act gtg aca gaa aaa gaa aga atc ctt cca cag agt aca tca gtg	1152
Asp Thr Val Thr Glu Lys Glu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Thr Ser Val	
370 375 380	

ES 2 605 646 T3

gaa gag gaa gtg ctc aaa ctg cag caa gca ctg tct gat gcg gaa aat	1200
Glu Glu Glu Val Leu Lys Leu Gln Gln Ala Leu Ser Asp Ala Glu Asn	
385	390 395 400
gaa att atg aga ctg agt aat tta tac cag gat aac agt ctc act gaa	1248
Glu Ile Met Arg Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Asp Asn Ser Leu Thr Glu	
405	410 415
gat aat ttg aaa ctt aaa atg cat gtc gaa ttt tta gaa aaa cag aag	1296
Asp Asn Leu Lys Leu Lys Met His Val Glu Phe Leu Glu Lys Gln Lys	
420	425 430
tcc tta ttg agt caa gaa aag gaa gag ctt caa cta tca ctt tta aag	1344
Ser Leu Leu Ser Gln Glu Lys Glu Glu Leu Gln Leu Ser Leu Leu Lys	
435	440 445
ttg aac aat gaa tat gaa gtg att aaa agt aca gct gtg aga gac atg	1392
Leu Asn Asn Glu Tyr Glu Val Ile Lys Ser Thr Ala Val Arg Asp Met	
450	455 460
gat atg gat tca aca tta tgt gat tta aga ctg acc ttg gag gca aag	1440
Asp Met Asp Ser Thr Leu Cys Asp Leu Arg Leu Thr Leu Glu Ala Lys	
465	470 475 480
gac cag gaa ctc aat cag agt ctc act gag aag gaa ata ttg gtt gct	1488
Asp Gln Glu Leu Asn Gln Ser Leu Thr Glu Lys Glu Ile Leu Val Ala	
485	490 495
gag tta gag gaa ttg gac aga caa aac caa gaa gct aca aag cac atg	1536
Glu Leu Glu Glu Leu Asp Arg Gln Asn Gln Glu Ala Thr Lys His Met	
500	505 510
att ctg ata aaa gat cag cta tca aaa caa caa agt gag gga gaa act	1584
Ile Leu Ile Lys Asp Gln Leu Ser Lys Gln Gln Ser Glu Gly Glu Thr	
515	520 525
atc att agt aaa ctg aga aaa gat cta aat gat gaa aac aag aga gtc	1632
Ile Ile Ser Lys Leu Arg Lys Asp Leu Asn Asp Glu Asn Lys Arg Val	
530	535 540
cat caa ctt gaa gat gat aaa aag aat atg act aaa gaa cta aat gtg	1680
His Gln Leu Glu Asp Asp Lys Lys Asn Met Thr Lys Glu Leu Asn Val	
545	550 555 560
cag aaa gag aag tta gtt caa agt gaa ctc gtc cta aat ggc ttg cat	1728
Gln Lys Glu Lys Leu Val Gln Ser Glu Leu Val Leu Asn Gly Leu His	
565	570 575
tta gcc aag cag aag ctt gag gag aaa gta gaa gat tta gtg gat cag	1776
Leu Ala Lys Gln Lys Leu Glu Glu Lys Val Glu Asp Leu Val Asp Gln	
580	585 590
cta aat aaa tca caa aaa agt aat tta aac atg cag aag gag aac ttt	1824
Leu Asn Lys Ser Gln Lys Ser Asn Leu Asn Met Gln Lys Glu Asn Phe	
595	600 605
gga ctt aag gaa cat att aaa caa aat gag gaa gag ctt tct aga gtc	1872
Gly Leu Lys Glu His Ile Lys Gln Asn Glu Glu Glu Leu Ser Arg Val	
610	615 620
agg gat gag tta act cag tct cta agt cga gac tct ggc agt gat ttt	1920

ES 2 605 646 T3

Arg 625	Asp	Glu	Leu	Thr	Gln 630	Ser	Leu	Ser	Arg	Asp 635	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe 640	
aag	gat	gac	tta	ctt	aaa	gaa	agg	gaa	gct	gaa	gtc	aga	aac	tta	aaa	1968
Lys	Asp	Asp	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Asn	Leu	Lys	
				645				650						655		
caa	aat	ctt	tca	gaa	ata	gaa	cag	ctc	aat	gac	agt	tta	aac	aaa	gtt	2016
Gln	Asn	Leu	Ser	Glu	Ile	Glu	Gln	Leu	Asn	Asp	Ser	Leu	Asn	Lys	Val	
			660					665						670		
gcc	ttt	gat	ctc	aaa	atg	gaa	aat	gaa	aag	ttg	gtc	tta	gcg	tgt	gaa	2064
Ala	Phe	Asp	Leu	Lys	Met	Glu	Asn	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Cys	Glu	
		675					680							685		
gat	ata	aga	cat	cag	ttg	gaa	gaa	tca	att	gtt	ggc	agc	aat	cag	atg	2112
Asp	Ile	Arg	His	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Asn	Gln	Met	
	690					695					700					
tct	ctg	gaa	aga	aac	act	att	gtg	gag	gct	cta	aaa	atg	gaa	aaa	gga	2160
Ser	Leu	Glu	Arg	Asn	Thr	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Met	Glu	Lys	Gly	
705					710					715					720	
cag	tta	gaa	gca	gaa	ttg	agt	cga	gct	gac	caa	agg	ctg	ttg	gaa	gaa	2208
Gln	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Ala	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Glu	
				725					730					735		
gcc	agt	aag	tat	gaa	cag	acg	att	caa	gag	cta	tca	aag	gca	cgt	gat	2256
Ala	Ser	Lys	Tyr	Glu	Gln	Thr	Ile	Gln	Glu	Leu	Ser	Lys	Ala	Arg	Asp	
			740					745						750		
ttg	agg	acc	tct	gct	tta	cag	ctg	gag	cag	cag	cat	tta	atg	aaa	ctc	2304
Leu	Arg	Thr	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Glu	Gln	Gln	His	Leu	Met	Lys	Leu	
		755					760							765		
agt	caa	gag	aag	gac	ttc	gaa	ata	gca	gaa	ctt	aaa	aag	aac	att	gaa	2352
Ser	Gln	Glu	Lys	Asp	Phe	Glu	Ile	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Asn	Ile	Glu	
		770				775								780		
cag	atg	gat	act	gat	cat	aaa	gaa	act	aag	gca	att	ttg	tca	tct	att	2400
Gln	Met	Asp	Thr	Asp	His	Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Ile	Leu	Ser	Ser	Ile	
785					790					795					800	
tta	gaa	gag	cag	aag	caa	ttg	acg	caa	ctt	ata	agt	gag	aag	gaa	att	2448
Leu	Glu	Glu	Gln	Lys	Gln	Leu	Thr	Gln	Leu	Ile	Ser	Glu	Lys	Glu	Ile	
				805					810					815		
ttt	att	gag	aaa	ctt	aaa	gaa	aga	agt	tca	gag	ctt	cag	gag	gaa	tta	2496
Phe	Ile	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Arg	Ser	Ser	Glu	Leu	Gln	Glu	Glu	Leu	
			820					825						830		
gag	aaa	tct	act	cag	gcc	tca	agg	aaa	att	gaa	att	tta	aag	caa	acc	2544
Glu	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ser	Arg	Lys	Ile	Glu	Ile	Leu	Lys	Gln	Thr	
			835				840							845		
att	gag	gag	aaa	gac	aga	agt	ctt	ggg	tcc	atg	aaa	gaa	gaa	aac	aat	2592
Ile	Glu	Glu	Lys	Asp	Arg	Ser	Leu	Gly	Ser	Met	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	
	850					855								860		
cat	ctg	aaa	gaa	gaa	ctg	gaa	cgg	ctc	cgt	gaa	cag	cag	agt	cga	gcc	2640
His	Leu	Lys	Glu	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Arg	Glu	Gln	Gln	Ser	Arg	Ala	

ES 2 605 646 T3

865		870		875		880	
gtg cct gtg gtg gag cct aaa ccc ctg gat agt gtt aca gag cta gaa							2688
Val Pro Val Val Glu Pro Lys Pro Leu Asp Ser Val Thr Glu Leu Glu							
		885		890		895	
tct gag gtg ttg cag cta aat ata gta aag agg aat ctt gag gag gaa							2736
Ser Glu Val Leu Gln Leu Asn Ile Val Lys Arg Asn Leu Glu Glu Glu							
		900		905		910	
ata aaa cgt cat cag aag att ata gaa gat caa aac cag agt aaa atg							2784
Ile Lys Arg His Gln Lys Ile Ile Glu Asp Gln Asn Gln Ser Lys Met							
		915		920		925	
cag ctg ctt cag tct cta gag gag cag aag aag gaa atg gat gaa ttt							2832
Gln Leu Leu Gln Ser Leu Glu Glu Gln Lys Lys Glu Met Asp Glu Phe							
		930		935		940	
aag tgc cag cat gag caa atg aac gtc aca cac acc caa ctc ttc tta							2880
Lys Cys Gln His Glu Gln Met Asn Val Thr His Thr Gln Leu Phe Leu							
		945		950		955	960
gag aaa gat gag gag att aag aat ttg caa aaa aca att gaa caa atc							2928
Glu Lys Asp Glu Glu Ile Lys Asn Leu Gln Lys Thr Ile Glu Gln Ile							
		965		970		975	
aaa acc caa tgg cat gaa gaa aga cag gac gtt caa atg gag aat tct							2976
Lys Thr Gln Trp His Glu Glu Arg Gln Asp Val Gln Met Glu Asn Ser							
		980		985		990	
gag ttc ttt caa gaa aca aaa gtg cag agc ctt aat cta gaa aat ggc							3024
Glu Phe Phe Gln Glu Thr Lys Val Gln Ser Leu Asn Leu Glu Asn Gly							
		995		1000		1005	
agt gaa aag cat gat tta tcg aaa gcc gaa act gag agg tta gta							3069
Ser Glu Lys His Asp Leu Ser Lys Ala Glu Thr Glu Arg Leu Val							
		1010		1015		1020	
aaa gga ata aaa gaa cga gag ctg gag att aaa ctt cta aat gaa							3114
Lys Gly Ile Lys Glu Arg Glu Leu Glu Ile Lys Leu Leu Asn Glu							
		1025		1030		1035	
aag aat ata tct tta aca aaa caa att gat cag ctg tcc aaa gat							3159
Lys Asn Ile Ser Leu Thr Lys Gln Ile Asp Gln Leu Ser Lys Asp							
		1040		1045		1050	
gag gtt ggt aaa ctc act cag atc atc cag cag aaa gac tta gag							3204
Glu Val Gly Lys Leu Thr Gln Ile Ile Gln Gln Lys Asp Leu Glu							
		1055		1060		1065	
ata caa gct ctt cat gct agg att tct tca gct tcc tac acc cag							3249
Ile Gln Ala Leu His Ala Arg Ile Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gln							
		1070		1075		1080	
gat gtt gtc tac ctt cag cag cag ctg cag gcc tat gct atg gag							3294
Asp Val Val Tyr Leu Gln Gln Gln Leu Gln Ala Tyr Ala Met Glu							
		1085		1090		1095	
aga gaa caa gta tta gct gtt ttg agt gag aag acc agg gaa aat							3339
Arg Glu Gln Val Leu Ala Val Leu Ser Glu Lys Thr Arg Glu Asn							
		1100		1105		1110	

ES 2 605 646 T3

agc cat	ctg aaa aca gaa tac	cac aaa atg atg gat	atc gtt gct	3384
Ser His	Leu Lys Thr Glu Tyr	His Lys Met Met Asp	Ile Val Ala	
1115	1120	1125		
gct aaa	gaa gca gct ctc att	aag ctg caa gat gaa	aat aaa aaa	3429
Ala Lys	Glu Ala Ala Leu Ile	Lys Leu Gln Asp Glu	Asn Lys Lys	
1130	1135	1140		
ttg tct	gct aga tcc gaa ggt	ggt ggc cag gat atg	ttt aga gag	3474
Leu Ser	Ala Arg Ser Glu Gly	Gly Gly Gln Asp Met	Phe Arg Glu	
1145	1150	1155		
act gtc	cag aat tta tca cgt	atc att cga gaa aaa	gac att gag	3519
Thr Val	Gln Asn Leu Ser Arg	Ile Ile Arg Glu Lys	Asp Ile Glu	
1160	1165	1170		
ata gat	gcg tta agt cag aag	tgc cag acc tta ttg	aca gtt tta	3564
Ile Asp	Ala Leu Ser Gln Lys	Cys Gln Thr Leu Leu	Thr Val Leu	
1175	1180	1185		
caa aca	tcg agc act ggg aat	gag gtt gga ggc gtt	aat agc aat	3609
Gln Thr	Ser Ser Thr Gly Asn	Glu Val Gly Gly Val	Asn Ser Asn	
1190	1195	1200		
cag ttt	gag gag ctt cta cag	gaa cgc gac aaa tta	aaa caa caa	3654
Gln Phe	Glu Glu Leu Leu Gln	Glu Arg Asp Lys Leu	Lys Gln Gln	
1205	1210	1215		
gta aag	aag atg gaa gag tgg	aaa cag cag gtg atg	acc aca gtt	3699
Val Lys	Lys Met Glu Glu Trp	Lys Gln Gln Val Met	Thr Thr Val	
1220	1225	1230		
cag aat	atg cag cat gag tca	gcc cag ctt caa gaa	gaa ctt cat	3744
Gln Asn	Met Gln His Glu Ser	Ala Gln Leu Gln Glu	Glu Leu His	
1235	1240	1245		
cag ctt	cag gca caa gtt ttg	gtt gac agt gat aat	aat tct aaa	3789
Gln Leu	Gln Ala Gln Val Leu	Val Asp Ser Asp Asn	Asn Ser Lys	
1250	1255	1260		
tta caa	gtg gat tat act ggc	ctg atc caa agt tat	gag cag aat	3834
Leu Gln	Val Asp Tyr Thr Gly	Leu Ile Gln Ser Tyr	Glu Gln Asn	
1265	1270	1275		
gaa act	aaa ctc aaa aat ttt	ggg cag gag cta gca	caa gtt cag	3879
Glu Thr	Lys Leu Lys Asn Phe	Gly Gln Glu Leu Ala	Gln Val Gln	
1280	1285	1290		
cac agc	ata ggg cag ctg tac	agt acc aaa gac ctt	ctc tta gga	3924
His Ser	Ile Gly Gln Leu Tyr	Ser Thr Lys Asp Leu	Leu Leu Gly	
1295	1300	1305		
aaa ctt	gat att att tct cct	caa ctc ccc tcc gga	tca tcg cct	3969
Lys Leu	Asp Ile Ile Ser Pro	Gln Leu Pro Ser Gly	Ser Ser Pro	
1310	1315	1320		
cct tcc	cag tca gca gag tct	ctt gga atg gat aag	cgt gat aca	4014
Pro Ser	Gln Ser Ala Glu Ser	Leu Gly Met Asp Lys	Arg Asp Thr	
1325	1330	1335		

ES 2 605 646 T3

tca agt gag tct tca aaa cag gag cta gaa gag cta aga aag tca	4059
Ser Ser Glu Ser Ser Lys Gln Glu Leu Glu Glu Leu Arg Lys Ser	
1340 1345 1350	
ctg cag gaa aaa gat gca acg att aaa aca ctc cag gaa aat aac	4104
Leu Gln Glu Lys Asp Ala Thr Ile Lys Thr Leu Gln Glu Asn Asn	
1355 1360 1365	
cac aga ttg tcc gat tca att gct gcc acc tca gag cta gaa aga	4149
His Arg Leu Ser Asp Ser Ile Ala Ala Thr Ser Glu Leu Glu Arg	
1370 1375 1380	
aaa gaa cac gaa cag act gat tca gaa att aag cag cta aag gag	4194
Lys Glu His Glu Gln Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Leu Lys Glu	
1385 1390 1395	
aaa caa gat gtt tta caa aag tca ctt aag gag aaa gac ctc tta	4239
Lys Gln Asp Val Leu Gln Lys Ser Leu Lys Glu Lys Asp Leu Leu	
1400 1405 1410	
atc aaa gcc aaa agt gat cag tta ctt tct tta aat gaa aat ttc	4284
Ile Lys Ala Lys Ser Asp Gln Leu Leu Ser Leu Asn Glu Asn Phe	
1415 1420 1425	
acc aac aaa gtg aat gaa aat gaa ctc ttg agg cag gca gta acc	4329
Thr Asn Lys Val Asn Glu Asn Glu Leu Leu Arg Gln Ala Val Thr	
1430 1435 1440	
aac ctg aag gag cgg gta tta att tta gaa atg gac att ggt aaa	4374
Asn Leu Lys Glu Arg Val Leu Ile Leu Glu Met Asp Ile Gly Lys	
1445 1450 1455	
cta aaa gaa gaa aat gaa aaa ata gtt gaa aga acc agg gaa aag	4419
Leu Lys Glu Glu Asn Glu Lys Ile Val Glu Arg Thr Arg Glu Lys	
1460 1465 1470	
gaa acg gag tat caa gca tta cag gag act aat atg aag ttt tcc	4464
Glu Thr Glu Tyr Gln Ala Leu Gln Glu Thr Asn Met Lys Phe Ser	
1475 1480 1485	
atg atg ctt cga gaa aaa gag ttt gag tgc cat tca atg aag gaa	4509
Met Met Leu Arg Glu Lys Glu Phe Glu Cys His Ser Met Lys Glu	
1490 1495 1500	
aaa tct ctt gca ttt gag cag cta ctg aaa gaa aaa gag cag ggc	4554
Lys Ser Leu Ala Phe Glu Gln Leu Leu Lys Glu Lys Glu Gln Gly	
1505 1510 1515	
aag act ggg gag tta aat caa ctt tta aat gca gtt aag tca atg	4599
Lys Thr Gly Glu Leu Asn Gln Leu Leu Asn Ala Val Lys Ser Met	
1520 1525 1530	
cag gag aag aca gtt aag ttt caa caa gag aga gac cag gtc atg	4644
Gln Glu Lys Thr Val Lys Phe Gln Gln Glu Arg Asp Gln Val Met	
1535 1540 1545	
ttg gcc ctg aaa cag aaa caa atg gaa aac agt gct tta cag aat	4689
Leu Ala Leu Lys Gln Lys Gln Met Glu Asn Ser Ala Leu Gln Asn	
1550 1555 1560	
gag gtt caa cat tta cgc gac aaa gaa tta cgc tta aac cag gag	4734

ES 2 605 646 T3

Glu Val	Gln His	Leu Arg	Asp	Lys Glu	Leu Arg	Leu	Asn Gln	Glu											
1565			1570			1575													
cta gag	aga ttg	cgt aac	cat	ctt tta	gaa tca	gag	gat tct	tac											4779
Leu Glu	Arg Leu	Arg Asn	His	Leu Leu	Glu Ser	Glu	Asp Ser	Tyr											
1580			1585			1590													
acc cgt	gaa gct	ttg gct	gca	gaa gag	aga gag	gcc	aaa ctg	aga											4824
Thr Arg	Glu Ala	Leu Ala	Ala	Glu Glu	Arg Glu	Ala	Lys Leu	Arg											
1595			1600			1605													
agg aaa	gtc aca	gta ttg	gag	gaa aag	cta gtt	tca	tct tct	aat											4869
Arg Lys	Val Thr	Val Leu	Glu	Glu Lys	Leu Val	Ser	Ser Ser	Asn											
1610			1615			1620													
gca atg	gaa aat	gca agc	cat	cag gcc	agt ttg	cag	gta gag	tca											4914
Ala Met	Glu Asn	Ala Ser	His	Gln Ala	Ser Leu	Gln	Val Glu	Ser											
1625			1630			1635													
ctg cag	gag cag	ctg aat	gtg	gtc tct	aag cag	agg	gat gaa	acc											4959
Leu Gln	Glu Gln	Leu Asn	Val	Val Ser	Lys Gln	Arg	Asp Glu	Thr											
1640			1645			1650													
gcc ctg	cag ctc	tct gtg	tct	cgg gaa	caa gta	aag	cag tat	gct											5004
Ala Leu	Gln Leu	Ser Val	Ser	Arg Glu	Gln Val	Lys	Gln Tyr	Ala											
1655			1660			1665													
ctc tca	ctc tcc	aac ctg	cag	atg gta	cta gag	cat	ttc cag	caa											5049
Leu Ser	Leu Ser	Asn Leu	Gln	Met Val	Leu Glu	His	Phe Gln	Gln											
1670			1675			1680													
gag gaa	aaa gct	gtg tat	tct	gct gaa	cta gaa	aag	cac aaa	cag											5094
Glu Glu	Lys Ala	Val Tyr	Ser	Ala Glu	Leu Glu	Lys	His Lys	Gln											
1685			1690			1695													
ctt gta	gct gaa	tgg aag	aaa	aag gca	gaa aat	ctg	gaa gga	aaa											5139
Leu Val	Ala Glu	Trp Lys	Lys	Lys Ala	Glu Asn	Leu	Glu Gly	Lys											
1700			1705			1710													
ctg atg	tca tta	cag gag	cgt	ttt gat	gaa gca	aat	gct gcg	ttg											5184
Leu Met	Ser Leu	Gln Glu	Arg	Phe Asp	Glu Ala	Asn	Ala Ala	Leu											
1715			1720			1725													
gat tca	gca tca	aga ctt	aca	gag cag	tta gat	tta	aag gaa	gaa											5229
Asp Ser	Ala Ser	Arg Leu	Thr	Glu Gln	Leu Asp	Leu	Lys Glu	Glu											
1730			1735			1740													
caa att	gaa gaa	ctt aaa	aaa	caa aat	gaa ctc	cga	caa gaa	atg											5274
Gln Ile	Glu Glu	Leu Lys	Lys	Gln Asn	Glu Leu	Arg	Gln Glu	Met											
1745			1750			1755													
ctg gat	gat gta	caa aag	aaa	ttg atg	aac tta	gta	aac agc	aca											5319
Leu Asp	Asp Val	Gln Lys	Lys	Leu Met	Asn Leu	Val	Asn Ser	Thr											
1760			1765			1770													
gaa gga	aaa gtg	gac aaa	gtc	cta atg	aga aac	ctc	ttc att	gga											5364
Glu Gly	Lys Val	Asp Lys	Val	Leu Met	Arg Asn	Leu	Phe Ile	Gly											
1775			1780			1785													
cat ttc	cac aca	cca aag	cat	cag cgc	cac gag	gtg	tta cga	tta											5409
His Phe	His Thr	Pro Lys	His	Gln Arg	His Glu	Val	Leu Arg	Leu											

ES 2 605 646 T3

1790		1795		1800	
atg gga agc atc ctt ggt atc aag agg gag gaa atg gaa cag ttg					5454
Met Gly Ser Ile Leu Gly Ile Lys Arg Glu Glu Met Glu Gln Leu					
1805		1810		1815	
ctt cat gaa gat cag ggt ggt gtt acc agg tgg atg act gga tgg					5499
Leu His Glu Asp Gln Gly Gly Val Thr Arg Trp Met Thr Gly Trp					
1820		1825		1830	
ctt gga gga gga tca aaa agt gtc ccc aac aca cct ctg aga cca					5544
Leu Gly Gly Gly Ser Lys Ser Val Pro Asn Thr Pro Leu Arg Pro					
1835		1840		1845	
aat caa caa tct gtg ctt aat agc tct ttt tca gaa ctt ttt gtt					5589
Asn Gln Gln Ser Val Leu Asn Ser Ser Phe Ser Glu Leu Phe Val					
1850		1855		1860	
aaa ttt cta gaa aca gaa tct cat cca tct gtt cca cca cca aag					5634
Lys Phe Leu Glu Thr Glu Ser His Pro Ser Val Pro Pro Pro Lys					
1865		1870		1875	
ctt tct gtt cat gat atg aaa cct ctg gat tca cca gga agg aga					5679
Leu Ser Val His Asp Met Lys Pro Leu Asp Ser Pro Gly Arg Arg					
1880		1885		1890	
aaa gta gtc ata cat gta tca gaa agt ttt aaa gaa acc aca gag					5724
Lys Val Val Ile His Val Ser Glu Ser Phe Lys Glu Thr Thr Glu					
1895		1900		1905	
tcc aga tgt gga agg aga aca gat gtg aat cca ttc ttg gct ccc					5769
Ser Arg Cys Gly Arg Arg Thr Asp Val Asn Pro Phe Leu Ala Pro					
1910		1915		1920	
cgc tct gca gct gtg cct ctc att aac cca gct gga ctt gga cct					5814
Arg Ser Ala Ala Val Pro Leu Ile Asn Pro Ala Gly Leu Gly Pro					
1925		1930		1935	
ggt ggg cct ggg cat ctt ctt ttg aag ccc atc tca gac gtg ttg					5859
Gly Gly Pro Gly His Leu Leu Leu Lys Pro Ile Ser Asp Val Leu					
1940		1945		1950	
ccc aca ttt aca cct ttg ccg gtg tca cct gac aac agt gct gga					5904
Pro Thr Phe Thr Pro Leu Pro Val Ser Pro Asp Asn Ser Ala Gly					
1955		1960		1965	
gtt gtg ttg aaa gac ctt tta aag caa tag atgattotca agccagagac					5954
Val Val Leu Lys Asp Leu Leu Lys Gln					
1970		1975			
aacatatgta gcactttaaa gaaaccatga acactatgtg tatgtacttt atcacaaagt					6014
ggcctttcag aaaaagtcac gtgtttgttt gc					6046

<210> 45  
 <211> 1977  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*

5

ES 2 605 646 T3

<400> 45

Met Ser Ser Trp Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Leu Gly Gln Ser Leu  
 1 5 10 15

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

Phe Thr Lys Asp Met Leu Met Glu Gly Thr Glu Glu Val Glu Ala Glu  
 35 40 45

Leu Pro Asn Ser Arg Arg Lys Glu Val Glu Ala Ile His Ala Ile Leu  
 50 55 60

Arg Ser Glu Asn Glu Arg Leu Lys Glu Leu Cys Thr Asp Leu Glu Glu  
 65 70 75 80

Lys His Glu Ala Ser Glu Leu Gln Ile Lys Gln Gln Ser Thr Asn Tyr  
 85 90 95

Arg Asn Gln Leu Gln Gln Lys Glu Val Glu Ile Ser His Leu Lys Ala  
 100 105 110

Arg Gln Ile Ala Leu Gln Asp Gln Leu Leu Lys Leu Gln Ser Ala Ala  
 115 120 125

Gln Ser Ala His Ser Gly Ala Ser Ser Val Pro Ala Ala Leu Ala Ser  
 130 135 140

Ser Pro Phe Ser Tyr Ser Val Ser His His Ala Ser Ala Phe His Asp  
 145 150 155 160

Asp Asp Met Asp Phe Ser Asp Ile Ile Ser Ser Gln Gln Glu Ile Asn  
 165 170 175

Arg Leu Ser Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Ser Glu Val Gly His Trp  
 180 185 190

Arg His Ile Ala Gln Thr Ser Lys Ala Gln Gly Ser Asn Ser Ser Asp  
 195 200 205

Gln Ser Glu Ile Cys Lys Leu Gln Ser Ile Ile Lys Glu Leu Lys Gln  
 210 215 220

Ile Arg Ser Gln Glu Ile Asp Asp His Gln His Glu Met Ser Val Leu  
 225 230 235 240

ES 2 605 646 T3

Gln Asn Ala His Gln Gln Lys Leu Thr Asp Ile Ser Arg Arg His Arg  
 245 250 255

Glu Glu Leu Arg Asp Tyr Glu Glu Arg Ile Glu Glu Leu Glu Asn Leu  
 260 265 270

Leu Glu Gln Gly Gly Ser Gly Ile Val Ile Pro Asp His Ser Lys Ile  
 275 280 285

His Glu Met Gln Lys Thr Ile Gln Asn Leu Gln Thr Glu Lys Val Ala  
 290 295 300

Ser Ile Lys Lys Ile Glu Glu Leu Glu Asp Lys Ile Lys Asp Ile Asp  
 305 310 315 320

Lys Lys Leu Ser Ser Ala Glu Asn Asp Arg Asp Val Leu Arg Lys Glu  
 325 330 335

Lys Glu Cys Leu Asn Val Glu Asn Arg Gln Ile Thr Glu Gln Cys Glu  
 340 345 350

Ser Leu Lys Leu Glu Cys Lys Leu Gln His Asp Ala Glu Lys Gln Gly  
 355 360 365

Asp Thr Val Thr Glu Lys Glu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Thr Ser Val  
 370 375 380

Glu Glu Glu Val Leu Lys Leu Gln Gln Ala Leu Ser Asp Ala Glu Asn  
 385 390 395 400

Glu Ile Met Arg Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Asp Asn Ser Leu Thr Glu  
 405 410 415

Asp Asn Leu Lys Leu Lys Met His Val Glu Phe Leu Glu Lys Gln Lys  
 420 425 430

Ser Leu Leu Ser Gln Glu Lys Glu Glu Leu Gln Leu Ser Leu Leu Lys  
 435 440 445

Leu Asn Asn Glu Tyr Glu Val Ile Lys Ser Thr Ala Val Arg Asp Met  
 450 455 460

Asp Met Asp Ser Thr Leu Cys Asp Leu Arg Leu Thr Leu Glu Ala Lys  
 465 470 475 480

Asp Gln Glu Leu Asn Gln Ser Leu Thr Glu Lys Glu Ile Leu Val Ala

ES 2 605 646 T3

				485						490						495
Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Asp	Arg	Gln	Asn	Gln	Glu	Ala	Thr	Lys	His	Met	
			500					505					510			
Ile	Leu	Ile	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Lys	Gln	Gln	Ser	Glu	Gly	Glu	Thr	
		515					520					525				
Ile	Ile	Ser	Lys	Leu	Arg	Lys	Asp	Leu	Asn	Asp	Glu	Asn	Lys	Arg	Val	
	530					535					540					
His	Gln	Leu	Glu	Asp	Asp	Lys	Lys	Asn	Met	Thr	Lys	Glu	Leu	Asn	Val	
545					550					555					560	
Gln	Lys	Glu	Lys	Leu	Val	Gln	Ser	Glu	Leu	Val	Leu	Asn	Gly	Leu	His	
				565					570					575		
Leu	Ala	Lys	Gln	Lys	Leu	Glu	Glu	Lys	Val	Glu	Asp	Leu	Val	Asp	Gln	
			580					585					590			
Leu	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Asn	Met	Gln	Lys	Glu	Asn	Phe	
		595					600					605				
Gly	Leu	Lys	Glu	His	Ile	Lys	Gln	Asn	Glu	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	
	610					615					620					
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Leu	Ser	Arg	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe	
625					630					635					640	
Lys	Asp	Asp	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Asn	Leu	Lys	
			645						650					655		
Gln	Asn	Leu	Ser	Glu	Ile	Glu	Gln	Leu	Asn	Asp	Ser	Leu	Asn	Lys	Val	
			660					665					670			
Ala	Phe	Asp	Leu	Lys	Met	Glu	Asn	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Cys	Glu	
		675					680					685				
Asp	Ile	Arg	His	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Asn	Gln	Met	
	690					695					700					
Ser	Leu	Glu	Arg	Asn	Thr	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Met	Glu	Lys	Gly	
705					710					715					720	
Gln	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Ala	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Glu	
			725						730					735		

ES 2 605 646 T3

Ala Ser Lys Tyr Glu Gln Thr Ile Gln Glu Leu Ser Lys Ala Arg Asp  
 740 745 750

Leu Arg Thr Ser Ala Leu Gln Leu Glu Gln Gln His Leu Met Lys Leu  
 755 760 765

Ser Gln Glu Lys Asp Phe Glu Ile Ala Glu Leu Lys Lys Asn Ile Glu  
 770 775 780

Gln Met Asp Thr Asp His Lys Glu Thr Lys Ala Ile Leu Ser Ser Ile  
 785 790 795 800

Leu Glu Glu Gln Lys Gln Leu Thr Gln Leu Ile Ser Glu Lys Glu Ile  
 805 810 815

Phe Ile Glu Lys Leu Lys Glu Arg Ser Ser Glu Leu Gln Glu Glu Leu  
 820 825 830

Glu Lys Ser Thr Gln Ala Ser Arg Lys Ile Glu Ile Leu Lys Gln Thr  
 835 840 845

Ile Glu Glu Lys Asp Arg Ser Leu Gly Ser Met Lys Glu Glu Asn Asn  
 850 855 860

His Leu Lys Glu Glu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Gln Gln Ser Arg Ala  
 865 870 875 880

Val Pro Val Val Glu Pro Lys Pro Leu Asp Ser Val Thr Glu Leu Glu  
 885 890 895

Ser Glu Val Leu Gln Leu Asn Ile Val Lys Arg Asn Leu Glu Glu Glu  
 900 905 910

Ile Lys Arg His Gln Lys Ile Ile Glu Asp Gln Asn Gln Ser Lys Met  
 915 920 925

Gln Leu Leu Gln Ser Leu Glu Glu Gln Lys Lys Glu Met Asp Glu Phe  
 930 935 940

Lys Cys Gln His Glu Gln Met Asn Val Thr His Thr Gln Leu Phe Leu  
 945 950 955 960

Glu Lys Asp Glu Glu Ile Lys Asn Leu Gln Lys Thr Ile Glu Gln Ile  
 965 970 975

ES 2 605 646 T3

Lys Thr Gln Trp His Glu Glu Arg Gln Asp Val Gln Met Glu Asn Ser  
 980 985 990

Glu Phe Phe Gln Glu Thr Lys Val Gln Ser Leu Asn Leu Glu Asn Gly  
 995 1000 1005

Ser Glu Lys His Asp Leu Ser Lys Ala Glu Thr Glu Arg Leu Val  
 1010 1015 1020

Lys Gly Ile Lys Glu Arg Glu Leu Glu Ile Lys Leu Leu Asn Glu  
 1025 1030 1035

Lys Asn Ile Ser Leu Thr Lys Gln Ile Asp Gln Leu Ser Lys Asp  
 1040 1045 1050

Glu Val Gly Lys Leu Thr Gln Ile Ile Gln Gln Lys Asp Leu Glu  
 1055 1060 1065

Ile Gln Ala Leu His Ala Arg Ile Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gln  
 1070 1075 1080

Asp Val Val Tyr Leu Gln Gln Gln Leu Gln Ala Tyr Ala Met Glu  
 1085 1090 1095

Arg Glu Gln Val Leu Ala Val Leu Ser Glu Lys Thr Arg Glu Asn  
 1100 1105 1110

Ser His Leu Lys Thr Glu Tyr His Lys Met Met Asp Ile Val Ala  
 1115 1120 1125

Ala Lys Glu Ala Ala Leu Ile Lys Leu Gln Asp Glu Asn Lys Lys  
 1130 1135 1140

Leu Ser Ala Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gln Asp Met Phe Arg Glu  
 1145 1150 1155

Thr Val Gln Asn Leu Ser Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Ile Glu  
 1160 1165 1170

Ile Asp Ala Leu Ser Gln Lys Cys Gln Thr Leu Leu Thr Val Leu  
 1175 1180 1185

Gln Thr Ser Ser Thr Gly Asn Glu Val Gly Gly Val Asn Ser Asn  
 1190 1195 1200

ES 2 605 646 T3

Gln Phe Glu Glu Leu Leu Gln Glu Arg Asp Lys Leu Lys Gln Gln  
1205 1210 1215

Val Lys Lys Met Glu Glu Trp Lys Gln Gln Val Met Thr Thr Val  
1220 1225 1230

Gln Asn Met Gln His Glu Ser Ala Gln Leu Gln Glu Glu Leu His  
1235 1240 1245

Gln Leu Gln Ala Gln Val Leu Val Asp Ser Asp Asn Asn Ser Lys  
1250 1255 1260

Leu Gln Val Asp Tyr Thr Gly Leu Ile Gln Ser Tyr Glu Gln Asn  
1265 1270 1275

Glu Thr Lys Leu Lys Asn Phe Gly Gln Glu Leu Ala Gln Val Gln  
1280 1285 1290

His Ser Ile Gly Gln Leu Tyr Ser Thr Lys Asp Leu Leu Leu Gly  
1295 1300 1305

Lys Leu Asp Ile Ile Ser Pro Gln Leu Pro Ser Gly Ser Ser Pro  
1310 1315 1320

Pro Ser Gln Ser Ala Glu Ser Leu Gly Met Asp Lys Arg Asp Thr  
1325 1330 1335

Ser Ser Glu Ser Ser Lys Gln Glu Leu Glu Glu Leu Arg Lys Ser  
1340 1345 1350

Leu Gln Glu Lys Asp Ala Thr Ile Lys Thr Leu Gln Glu Asn Asn  
1355 1360 1365

His Arg Leu Ser Asp Ser Ile Ala Ala Thr Ser Glu Leu Glu Arg  
1370 1375 1380

Lys Glu His Glu Gln Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Leu Lys Glu  
1385 1390 1395

Lys Gln Asp Val Leu Gln Lys Ser Leu Lys Glu Lys Asp Leu Leu  
1400 1405 1410

Ile Lys Ala Lys Ser Asp Gln Leu Leu Ser Leu Asn Glu Asn Phe  
1415 1420 1425

Thr Asn Lys Val Asn Glu Asn Glu Leu Leu Arg Gln Ala Val Thr

ES 2 605 646 T3

1430		1435		1440
Asn Leu Lys Glu Arg Val	Leu Ile Leu Glu Met Asp	Ile Gly Lys		
1445	1450	1455		
Leu Lys Glu Glu Asn Glu	Lys Ile Val Glu Arg Thr	Arg Glu Lys		
1460	1465	1470		
Glu Thr Glu Tyr Gln Ala	Leu Gln Glu Thr Asn Met	Lys Phe Ser		
1475	1480	1485		
Met Met Leu Arg Glu Lys	Glu Phe Glu Cys His Ser	Met Lys Glu		
1490	1495	1500		
Lys Ser Leu Ala Phe Glu	Gln Leu Leu Lys Glu	Lys Glu Gln Gly		
1505	1510	1515		
Lys Thr Gly Glu Leu Asn	Gln Leu Leu Asn Ala Val	Lys Ser Met		
1520	1525	1530		
Gln Glu Lys Thr Val Lys	Phe Gln Gln Glu Arg Asp	Gln Val Met		
1535	1540	1545		
Leu Ala Leu Lys Gln Lys	Gln Met Glu Asn Ser Ala	Leu Gln Asn		
1550	1555	1560		
Glu Val Gln His Leu Arg	Asp Lys Glu Leu Arg Leu	Asn Gln Glu		
1565	1570	1575		
Leu Glu Arg Leu Arg Asn	His Leu Leu Glu Ser Glu	Asp Ser Tyr		
1580	1585	1590		
Thr Arg Glu Ala Leu Ala	Ala Glu Glu Arg Glu Ala	Lys Leu Arg		
1595	1600	1605		
Arg Lys Val Thr Val Leu	Glu Glu Lys Leu Val Ser	Ser Ser Asn		
1610	1615	1620		
Ala Met Glu Asn Ala Ser	His Gln Ala Ser Leu Gln	Val Glu Ser		
1625	1630	1635		
Leu Gln Glu Gln Leu Asn	Val Val Ser Lys Gln Arg	Asp Glu Thr		
1640	1645	1650		
Ala Leu Gln Leu Ser Val	Ser Arg Glu Gln Val Lys	Gln Tyr Ala		
1655	1660	1665		

ES 2 605 646 T3

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

ES 2 605 646 T3

Lys Val Val Ile His Val Ser Glu Ser Phe Lys Glu Thr Thr Glu  
 1895 1900 1905

Ser Arg Cys Gly Arg Arg Thr Asp Val Asn Pro Phe Leu Ala Pro  
 1910 1915 1920

Arg Ser Ala Ala Val Pro Leu Ile Asn Pro Ala Gly Leu Gly Pro  
 1925 1930 1935

Gly Gly Pro Gly His Leu Leu Leu Lys Pro Ile Ser Asp Val Leu  
 1940 1945 1950

Pro Thr Phe Thr Pro Leu Pro Val Ser Pro Asp Asn Ser Ala Gly  
 1955 1960 1965

Val Val Leu Lys Asp Leu Leu Lys Gln  
 1970 1975

5 <210> 46  
 <211> 6452  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (357)..(6296)  
 <223>

<400> 46

ES 2 605 646 T3

cgagcagagtg tcatggcggc cggcgtcgag ttggcaggag taaccacgg aactgaggaa	60
agtcattaga gctgagaaag aagtggccca atctggacgg tgggaattcg tgggaatgag	120
cagaaggccc tccgtagtga ctgtgtcact agaggcgggc ccttggtaaa attccaggcc	180
aggcctctgc gtttctaggc agaacctgga gtgggccttg cctgagaacc cagctttgtg	240
ttatcgtatc ctgtctcgcg aaggcaggcg ttcaaggata tttggtcgga tgcocggcg	300
gcgctaaacg ttttctttt tccgagcggg ccgggtcggt ctctaaactc gccggc atg	359
	Met
	1
tcg tcc tgg ctt ggg ggc ctc ggc tcc gga ttg ggc cag tct ctg ggt	407
Ser Ser Trp Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Leu Gly Gln Ser Leu Gly	
	5 10 15
caa gtc ggg ggc agc ctg gct tcc ctc act ggc cag ata tca aac ttt	455
Gln Val Gly Gly Ser Leu Ala Ser Leu Thr Gly Gln Ile Ser Asn Phe	
	20 25 30
aca aag gat atg ctg atg gag ggc acg gag gaa gtg gaa gca gaa tta	503
Thr Lys Asp Met Leu Met Glu Gly Thr Glu Glu Val Glu Ala Glu Leu	
	35 40 45

ES 2 605 646 T3

cct gat tct agg aca aag gaa att gaa gcc att cat gca atc ttg aga 551  
Pro Asp Ser Arg Thr Lys Glu Ile Glu Ala Ile His Ala Ile Leu Arg  
50 55 60 65

tca gag aat gaa agg ctt aag aaa ctt tgt act gat cta gaa gag aaa 599  
Ser Glu Asn Glu Arg Leu Lys Lys Leu Cys Thr Asp Leu Glu Glu Lys  
70 75 80

cat gaa gca tca gag att caa ata aag cag caa tct aca agt tac cga 647  
His Glu Ala Ser Glu Ile Gln Ile Lys Gln Gln Ser Thr Ser Tyr Arg  
85 90 95

aat caa ctt caa caa aaa gag gta gaa atc agc cat ctt aaa gcc aga 695  
Asn Gln Leu Gln Gln Lys Glu Val Glu Ile Ser His Leu Lys Ala Arg  
100 105 110

cag att gca ctc cag gat cag ttg ctg aaa ctg cag tca gct gct cag 743  
Gln Ile Ala Leu Gln Asp Gln Leu Leu Lys Leu Gln Ser Ala Ala Gln  
115 120 125

tca gta cct tca gga gct ggt gta cca gca acc act gca tca tct tca 791  
Ser Val Pro Ser Gly Ala Gly Val Pro Ala Thr Thr Ala Ser Ser Ser  
130 135 140 145

ttc gct tat ggg att agt cat cat cct tca gct ttc cat gac gat gac 839  
Phe Ala Tyr Gly Ile Ser His His Pro Ser Ala Phe His Asp Asp Asp  
150 155 160

atg gac ttt ggt gat ata att tca tcc caa caa gaa ata aac cga ctc 887  
Met Asp Phe Gly Asp Ile Ile Ser Ser Gln Gln Glu Ile Asn Arg Leu  
165 170 175

tca aat gaa gtt tca aga ctt gag tct gaa gtt ggc cat tgg agg cat 935  
Ser Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Ser Glu Val Gly His Trp Arg His  
180 185 190

att gct cag act tcc aaa gca caa gga aca gat aac tct gat caa agt 983  
Ile Ala Gln Thr Ser Lys Ala Gln Gly Thr Asp Asn Ser Asp Gln Ser  
195 200 205

gaa ata tgt aaa cta caa aat atc att aag gaa cta aaa cag aac cga 1031  
Glu Ile Cys Lys Leu Gln Asn Ile Ile Lys Glu Leu Lys Gln Asn Arg  
210 215 220 225

agt cag gaa att gat gac cat caa cat gaa atg tca gta ctg cag aat 1079  
Ser Gln Glu Ile Asp Asp His Gln His Glu Met Ser Val Leu Gln Asn  
230 235 240

gca cac caa cag aaa ttg aca gaa ata agt cga cga cat cga gaa gaa 1127  
Ala His Gln Gln Lys Leu Thr Glu Ile Ser Arg Arg His Arg Glu Glu  
245 250 255

tta agt gac tat gaa gaa cga att gaa gaa ctt gaa aat ctg tta caa 1175  
Leu Ser Asp Tyr Glu Glu Arg Ile Glu Glu Leu Glu Asn Leu Leu Gln  
260 265 270

caa ggt ggc tct gga gtt ata gaa act gat ctc tct aaa atc tat gag 1223  
Gln Gly Gly Ser Gly Val Ile Glu Thr Asp Leu Ser Lys Ile Tyr Glu  
275 280 285

ES 2 605 646 T3

atg caa aaa act att caa gtt cta caa ata gaa aaa gtg gag tct acc	1271
Met Gln Lys Thr Ile Gln Val Leu Gln Ile Glu Lys Val Glu Ser Thr	
290 295 300 305	
aaa aaa atg gaa caa ctt gag gat aaa ata aaa gat ata aat aaa aaa	1319
Lys Lys Met Glu Gln Leu Glu Asp Lys Ile Lys Asp Ile Asn Lys Lys	
310 315 320	
tta tct tct gca gaa aat gac aga gat att ttg agg agg gaa caa gaa	1367
Leu Ser Ser Ala Glu Asn Asp Arg Asp Ile Leu Arg Arg Glu Gln Glu	
325 330 335	
cag cta aat gtg gaa aag aga caa ata atg gaa gaa tgt gaa aac ttg	1415
Gln Leu Asn Val Glu Lys Arg Gln Ile Met Glu Glu Cys Glu Asn Leu	
340 345 350	
aaa ttg gaa tgt agt aaa ttg cag cct tct gct gtg aag caa agt gat	1463
Lys Leu Glu Cys Ser Lys Leu Gln Pro Ser Ala Val Lys Gln Ser Asp	
355 360 365	
act atg aca gaa aag gaa aga att ctt gcc cag agt gca tca gtg gaa	1511
Thr Met Thr Glu Lys Glu Arg Ile Leu Ala Gln Ser Ala Ser Val Glu	
370 375 380 385	
gaa gtg ttc aga cta caa caa gca ctg tct gat gcc gaa aat gaa ata	1559
Glu Val Phe Arg Leu Gln Gln Ala Leu Ser Asp Ala Glu Asn Glu Ile	
390 395 400	
atg aga ttg agt agt tta aac cag gat aac agt ctt gct gaa gac aat	1607
Met Arg Leu Ser Ser Leu Asn Gln Asp Asn Ser Leu Ala Glu Asp Asn	
405 410 415	
ctg aaa ctt aaa atg cgt atc gaa gtt tta gaa aaa gag aag tca tta	1655
Leu Lys Leu Lys Met Arg Ile Glu Val Leu Glu Lys Glu Lys Ser Leu	
420 425 430	
ctg agt caa gaa aag gaa gaa ctt cag atg tca ctt tta aaa ttg aac	1703
Leu Ser Gln Glu Lys Glu Glu Leu Gln Met Ser Leu Leu Lys Leu Asn	
435 440 445	
aat gaa tat gaa gta att aaa agt aca gct aca aga gac ata agt ttg	1751
Asn Glu Tyr Glu Val Ile Lys Ser Thr Ala Thr Arg Asp Ile Ser Leu	
450 455 460 465	
gat tca gaa tta cat gac tta aga ctt aat ttg gag gca aag gaa caa	1799
Asp Ser Glu Leu His Asp Leu Arg Leu Asn Leu Glu Ala Lys Glu Gln	
470 475 480	
gaa ctc aat cag agt att agt gaa aag gaa aca ctg ata gct gag ata	1847
Glu Leu Asn Gln Ser Ile Ser Glu Lys Glu Thr Leu Ile Ala Glu Ile	
485 490 495	
gaa gaa ttg gac aga cag aat caa gaa gct aca aag cac atg att ttg	1895
Glu Glu Leu Asp Arg Gln Asn Gln Glu Ala Thr Lys His Met Ile Leu	
500 505 510	
ata aaa gat cag cta tca aaa caa caa aat gaa gga gat agc atc atc	1943
Ile Lys Asp Gln Leu Ser Lys Gln Gln Asn Glu Gly Asp Ser Ile Ile	
515 520 525	
agt aaa ctg aaa caa gat cta aat gat gaa aaa aag aga gtt cat caa	1991

ES 2 605 646 T3

Ser	Lys	Leu	Lys	Gln	Asp	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Lys	Arg	Val	His	Gln		
530					535					540					545		
ctt	gaa	gat	gat	aaa	atg	gac	att	act	aaa	gag	tta	gat	gta	cag	aaa		2039
Leu	Glu	Asp	Asp	Lys	Met	Asp	Ile	Thr	Lys	Glu	Leu	Asp	Val	Gln	Lys		
				550					555					560			
gaa	aag	cta	att	caa	agt	gaa	gtg	gcc	cta	aat	gat	tta	cat	tta	acc		2087
Glu	Lys	Leu	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	His	Leu	Thr		
			565					570					575				
aag	cag	aaa	ctt	gag	gac	aaa	gta	gaa	aat	tta	gta	gat	cag	cta	aat		2135
Lys	Gln	Lys	Leu	Glu	Asp	Lys	Val	Glu	Asn	Leu	Val	Asp	Gln	Leu	Asn		
		580					585					590					
aaa	tca	caa	gaa	agt	aat	gta	agc	atc	cag	aag	gag	aat	tta	gaa	ctt		2183
Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Asn	Val	Ser	Ile	Gln	Lys	Glu	Asn	Leu	Glu	Leu		
	595					600					605						
aag	gag	cat	att	aga	caa	aat	gag	gag	gag	ctt	tct	aga	ata	agg	aat		2231
Lys	Glu	His	Ile	Arg	Gln	Asn	Glu	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg	Ile	Arg	Asn		
610					615					620					625		
gag	tta	atg	cag	tct	cta	aat	caa	gac	tct	aat	agt	aat	ttt	aag	gat		2279
Glu	Leu	Met	Gln	Ser	Leu	Asn	Gln	Asp	Ser	Asn	Ser	Asn	Phe	Lys	Asp		
				630					635					640			
acc	tta	ctt	aaa	gaa	aga	gaa	gct	gaa	gtt	aga	aac	tta	aag	caa	aat		2327
Thr	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Asn	Leu	Lys	Gln	Asn		
			645					650					655				
ctt	tca	gaa	tta	gaa	cag	ctc	aat	gaa	aat	tta	aag	aaa	gtt	gct	ttt		2375
Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Gln	Leu	Asn	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Val	Ala	Phe		
		660					665					670					
gat	gtc	aaa	atg	gaa	aat	gaa	aag	tta	gtt	tta	gca	tgt	gaa	gat	gtg		2423
Asp	Val	Lys	Met	Glu	Asn	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Cys	Glu	Asp	Val		
	675					680					685						
agg	cat	cag	tta	gaa	gaa	tgt	ctt	gct	ggt	aac	aat	cag	ctt	tct	ctg		2471
Arg	His	Gln	Leu	Glu	Glu	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Asn	Gln	Leu	Ser	Leu		
690						695				700					705		
gaa	aaa	aac	act	att	gtg	gag	act	cta	aaa	atg	gaa	aaa	gga	gag	ata		2519
Glu	Lys	Asn	Thr	Ile	Val	Glu	Thr	Leu	Lys	Met	Glu	Lys	Gly	Glu	Ile		
				710					715					720			
gag	gca	gaa	ttg	tgt	tgg	gct	aaa	aag	agg	ctg	ttg	gaa	gaa	gca	aac		2567
Glu	Ala	Glu	Leu	Cys	Trp	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Glu	Ala	Asn		
			725					730					735				
aag	tat	gag	aaa	acc	att	gaa	gaa	ctg	tca	aat	gca	cgt	aat	ttg	aat		2615
Lys	Tyr	Glu	Lys	Thr	Ile	Glu	Glu	Leu	Ser	Asn	Ala	Arg	Asn	Leu	Asn		
		740					745					750					
acc	tct	gcc	tta	cag	ctg	gaa	cat	gag	cat	tta	att	aaa	ctc	aat	caa		2663
Thr	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Glu	His	Leu	Ile	Lys	Leu	Asn	Gln		
		755				760					765						
aag	aaa	gac	atg	gaa	ata	gca	gaa	ctc	aaa	aag	aat	att	gaa	caa	atg		2711
Lys	Lys	Asp	Met	Glu	Ile	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Asn	Ile	Glu	Gln	Met		



ES 2 605 646 T3

ata Ile 1025	aaa Lys	gag Glu	cga Arg	gaa Glu	ctg Leu	gag Glu	att Ile	aaa Lys	ctt Leu	cta Leu	aat Asn	gaa Glu	aag Lys	aat Asn	3473
					1030					1035					
ata Ile 1040	tct Ser	tta Leu	act Thr	aaa Lys	cag Gln	att Ile	gat Asp	cag Gln	ttg Leu	tcc Ser	aaa Lys	gat Asp	gaa Glu	gtt Val	3518
					1045					1050					
ggt Gly 1055	aaa Lys	cta Leu	act Thr	cag Gln	att Ile	att Ile	cag Gln	cag Gln	aaa Lys	gat Asp	ttg Leu	gag Glu	ata Ile	caa Gln	3563
					1060					1065					
gct Ala 1070	ctt Leu	cat His	gct Ala	aga Arg	att Ile	tct Ser	tca Ser	act Thr	tcc Ser	cat His	act Thr	caa Gln	gat Asp	gtt Val	3608
					1075					1080					
gtt Val 1085	tac Tyr	ctt Leu	caa Gln	cag Gln	caa Gln	ctg Leu	cag Gln	gct Ala	tat Tyr	gct Ala	atg Met	gaa Glu	aga Arg	gaa Glu	3653
					1090					1095					
aag Lys 1100	gta Val	ttt Phe	gct Ala	gtt Val	ttg Leu	aat Asn	gag Glu	aag Lys	act Thr	agg Arg	gaa Glu	aat Asn	agc Ser	cat His	3698
					1105					1110					
cta Leu 1115	aaa Lys	aca Thr	gaa Glu	tat Tyr	cac His	aaa Lys	atg Met	atg Met	gat Asp	att Ile	gtt Val	gct Ala	gcc Ala	aag Lys	3743
					1120					1125					
gaa Glu 1130	gca Ala	gct Ala	ctt Leu	atc Ile	aaa Lys	ctg Leu	caa Gln	gat Asp	gaa Glu	aat Asn	aaa Lys	aaa Lys	ttg Leu	tcc Ser	3788
					1135					1140					
act Thr 1145	aga Arg	ttt Phe	gaa Glu	agt Ser	agt Ser	ggc Gly	caa Gln	gat Asp	atg Met	ttt Phe	aga Arg	gaa Glu	act Thr	att Ile	3833
					1150					1155					
cag Gln 1160	aat Asn	tta Leu	tca Ser	cgt Arg	atc Ile	att Ile	cga Arg	gaa Glu	aaa Lys	gac Asp	atc Ile	gaa Glu	ata Ile	gat Asp	3878
					1165					1170					
gca Ala 1175	cta Leu	agt Ser	cag Gln	aaa Lys	tgt Cys	cag Gln	act Thr	tta Leu	ttg Leu	gca Ala	gtt Val	tta Leu	caa Gln	aca Thr	3923
					1180					1185					
tcc Ser 1190	agc Ser	act Thr	ggt Gly	aat Asn	gag Glu	gct Ala	gga Gly	ggt Gly	gtt Val	aat Asn	agt Ser	cat His	caa Gln	ttt Phe	3968
					1195					1200					
gag Glu 1205	gag Glu	ctt Leu	cta Leu	cag Gln	gaa Glu	cgt Arg	gac Asp	aag Lys	tta Leu	aaa Lys	cag Gln	caa Gln	gta Val	aag Lys	4013
					1210					1215					
aaa Lys 1220	atg Met	gaa Glu	gag Glu	tgg Trp	aag Lys	cag Gln	cag Gln	gtg Val	atg Met	acc Thr	aca Thr	gta Val	caa Gln	aat Asn	4058
					1225					1230					
atg Met 1235	caa Gln	cac His	gag Glu	tca Ser	gcc Ala	cag Gln	ctt Leu	cag Gln	gaa Glu	gag Glu	ctt Leu	cac His	caa Gln	ctt Leu	4103
					1240					1245					

ES 2 605 646 T3

caa	gca	cag	gtt	ttg	gtt	gac	agt	gat	aat	aat	tct	aaa	tta	caa	4148
Gln	Ala	Gln	Val	Leu	Val	Asp	Ser	Asp	Asn	Asn	Ser	Lys	Leu	Gln	
1250					1255					1260					
gtg	gac	tat	act	ggc	ctg	atc	caa	agt	tat	gag	cag	aat	gaa	acc	4193
Val	Asp	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Gln	Ser	Tyr	Glu	Gln	Asn	Glu	Thr	
1265					1270					1275					
aaa	ctc	aaa	aat	ttt	ggg	cag	gaa	tta	gca	caa	gtt	cag	cac	agc	4238
Lys	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Gln	Glu	Leu	Ala	Gln	Val	Gln	His	Ser	
1280					1285					1290					
att	ggg	cag	ctt	tgc	aat	acc	aag	gat	ctt	ctt	tta	gga	aaa	ctt	4283
Ile	Gly	Gln	Leu	Cys	Asn	Thr	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Lys	Leu	
1295					1300					1305					
gat	att	att	tca	ccc	cag	ctg	tct	tct	gca	tca	ttg	ctt	act	ccc	4328
Asp	Ile	Ile	Ser	Pro	Gln	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Pro	
1310					1315					1320					
cag	tct	gca	gag	tgt	ctt	aga	gca	agt	aag	tct	gaa	gta	ttg	agt	4373
Gln	Ser	Ala	Glu	Cys	Leu	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Glu	Val	Leu	Ser	
1325					1330					1335					
gaa	tct	tct	gaa	ttg	ctt	cag	caa	gag	tta	gaa	gag	cta	aga	aaa	4418
Glu	Ser	Ser	Glu	Leu	Leu	Gln	Gln	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	
1340					1345					1350					
tca	cta	cag	gaa	aaa	gat	gca	aca	att	aga	act	ctc	cag	gaa	aat	4463
Ser	Leu	Gln	Glu	Lys	Asp	Ala	Thr	Ile	Arg	Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	
1355					1360					1365					
aac	cac	aga	ttg	tct	gat	tcg	att	gct	gcc	acc	tca	gag	cta	gaa	4508
Asn	His	Arg	Leu	Ser	Asp	Ser	Ile	Ala	Ala	Thr	Ser	Glu	Leu	Glu	
1370					1375					1380					
aga	aaa	gaa	cac	gaa	caa	acc	gat	tca	gaa	atc	aag	cag	cta	aag	4553
Arg	Lys	Glu	His	Glu	Gln	Thr	Asp	Ser	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Lys	
1385					1390					1395					
gag	aaa	caa	gat	gtt	ttg	caa	aag	tta	ctt	aag	gaa	aaa	gac	ctc	4598
Glu	Lys	Gln	Asp	Val	Leu	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Lys	Asp	Leu	
1400					1405					1410					
tta	atc	aaa	gcc	aaa	agt	gat	caa	cta	ctt	tct	tcc	aat	gaa	aat	4643
Leu	Ile	Lys	Ala	Lys	Ser	Asp	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Glu	Asn	
1415					1420					1425					
ttc	act	aac	aaa	gta	aat	gaa	aac	gaa	ctt	ttg	agg	cag	gca	gta	4688
Phe	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Glu	Asn	Glu	Leu	Leu	Arg	Gln	Ala	Val	
1430					1435					1440					
aca	aac	ctg	aag	gag	aga	ata	tta	att	cta	gag	atg	gac	att	ggc	4733
Thr	Asn	Leu	Lys	Glu	Arg	Ile	Leu	Ile	Leu	Glu	Met	Asp	Ile	Gly	
1445					1450					1455					
aaa	cta	aaa	gga	gaa	aat	gaa	aaa	ata	gtg	gaa	aca	tac	agg	gga	4778
Lys	Leu	Lys	Gly	Glu	Asn	Glu	Lys	Ile	Val	Glu	Thr	Tyr	Arg	Gly	
1460					1465					1470					
aag	gaa	aca	gaa	tat	caa	gcg	tta	caa	gag	act	aac	atg	aag	ttt	4823

ES 2 605 646 T3

Lys 1475	Glu	Thr	Glu	Tyr	Gln 1480	Ala	Leu	Gln	Glu	Thr 1485	Asn	Met	Lys	Phe	
tct Ser 1490	atg Met	atg Met	ctg Leu	cga Arg	gaa Glu 1495	aaa Lys	gag Glu	ttt Phe	gag Glu	tgc Cys 1500	cac His	tca Ser	atg Met	aag Lys	4868
gag Glu 1505	aag Lys	gct Ala	ctt Leu	gct Ala	ttt Phe 1510	gaa Glu	cag Gln	cta Leu	ttg Leu	aaa Lys 1515	gag Glu	aaa Lys	gaa Glu	cag Gln	4913
ggc Gly 1520	aag Lys	act Thr	gga Gly	gag Glu	tta Leu 1525	aat Asn	cag Gln	ctt Leu	tta Leu	aat Asn 1530	gca Ala	gtt Val	aaa Lys	tca Ser	4958
atg Met 1535	cag Gln	gag Glu	aag Lys	aca Thr	gtt Val 1540	gtg Val	ttt Phe	caa Gln	cag Gln	gag Glu 1545	aga Arg	gac Asp	caa Gln	gtc Val	5003
atg Met 1550	ttg Leu	gcc Ala	ctg Leu	aaa Lys	caa Gln 1555	aaa Lys	caa Gln	atg Met	gaa Glu	aat Asn 1560	act Thr	gcc Ala	cta Leu	cag Gln	5048
aat Asn 1565	gag Glu	ggt Val	caa Gln	cgt Arg	tta Leu 1570	cgt Arg	gac Asp	aaa Lys	gaa Glu	ttt Phe 1575	cgt Arg	tca Ser	aac Asn	caa Gln	5093
gag Glu 1580	cta Leu	gag Glu	aga Arg	ttg Leu	cgt Arg 1585	aat Asn	cat His	ctt Leu	tta Leu	gaa Glu 1590	tca Ser	gaa Glu	gat Asp	tct Ser	5138
tat Tyr 1595	acc Thr	cgt Arg	gaa Glu	gct Ala	ttg Leu 1600	gct Ala	gca Ala	gaa Glu	gat Asp	aga Arg 1605	gag Glu	gct Ala	aaa Lys	cta Leu	5183
aga Arg 1610	aag Lys	aaa Lys	gtc Val	aca Thr	gta Val 1615	ttg Leu	gag Glu	gaa Glu	aag Lys	cta Leu 1620	gtt Val	tca Ser	tcc Ser	tct Ser	5228
aat Asn 1625	gca Ala	atg Met	gaa Glu	aat Asn	gca Ala 1630	agc Ser	cat His	caa Gln	gcc Ala	agt Ser 1635	gtg Val	cag Gln	gta Val	gag Glu	5273
tca Ser 1640	ttg Leu	caa Gln	gaa Glu	cag Gln	ttg Leu 1645	aat Asn	gta Val	gtt Val	tcc Ser	aag Lys 1650	caa Gln	agg Arg	gat Asp	gaa Glu	5318
act Thr 1655	gcg Ala	ctg Leu	cag Gln	ctt Leu	tct Ser 1660	gtc Val	tct Ser	cag Gln	gaa Glu	caa Gln 1665	gta Val	aag Lys	cag Gln	tat Tyr	5363
gct Ala 1670	ctg Leu	tca Ser	ctg Leu	gcc Ala	aac Asn 1675	ctg Leu	cag Gln	atg Met	gta Val	cta Leu 1680	gag Glu	cat His	ttc Phe	caa Gln	5408
caa Gln 1685	gag Glu	gaa Glu	aaa Lys	gct Ala	atg Met 1690	tat Tyr	tct Ser	gct Ala	gaa Glu	ctc Leu 1695	gaa Glu	aag Lys	caa Gln	aaa Lys	5453
cag Gln	ctt Leu	ata Ile	gct Ala	gaa Glu	tgg Trp	aag Lys	aaa Lys	aac Asn	gca Ala	gaa Glu	aat Asn	ctg Leu	gaa Glu	gga Gly	5498

ES 2 605 646 T3

1700		1705		1710											
aaa	gtg	ata	tca	tta	cag	gaa	tgt	ttg	gat	gaa	gca	aat	gct	gca	5543
Lys	Val	Ile	Ser	Leu	Gln	Glu	Cys	Leu	Asp	Glu	Ala	Asn	Ala	Ala	
1715					1720					1725					
ttg	gat	tca	gca	tca	aga	ctt	aca	gaa	cag	tta	gat	gta	aaa	gaa	5588
Leu	Asp	Ser	Ala	Ser	Arg	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu	Asp	Val	Lys	Glu	
1730					1735					1740					
gaa	caa	att	gaa	gaa	ctt	aaa	aga	caa	aat	gag	ctc	cga	caa	gaa	5633
Glu	Gln	Ile	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Gln	Asn	Glu	Leu	Arg	Gln	Glu	
1745					1750					1755					
atg	ctg	gat	gat	gta	caa	aag	aaa	ttg	atg	agc	tta	gca	aac	agc	5678
Met	Leu	Asp	Asp	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Leu	Ala	Asn	Ser	
1760					1765					1770					
tca	gaa	gga	aaa	gta	gac	aaa	gtc	cta	atg	aga	aac	ctc	ttc	att	5723
Ser	Glu	Gly	Lys	Val	Asp	Lys	Val	Leu	Met	Arg	Asn	Leu	Phe	Ile	
1775					1780					1785					
ggt	cat	ttc	cac	aca	ccg	aaa	aat	cag	cgt	cat	gaa	gtg	tta	cgg	5768
Gly	His	Phe	His	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	Arg	His	Glu	Val	Leu	Arg	
1790					1795					1800					
tta	atg	ggg	agc	atc	ctg	ggc	gtc	aga	agg	gag	gag	atg	gag	cag	5813
Leu	Met	Gly	Ser	Ile	Leu	Gly	Val	Arg	Arg	Glu	Glu	Met	Glu	Gln	
1805					1810					1815					
ttg	ttt	cat	gac	gat	cag	ggc	agt	ggt	acc	agg	tgg	atg	act	ggg	5858
Leu	Phe	His	Asp	Asp	Gln	Gly	Ser	Val	Thr	Arg	Trp	Met	Thr	Gly	
1820					1825					1830					
tgg	ctt	gga	gga	gga	tca	aaa	agt	ggt	ccc	aac	aca	cct	ttg	aga	5903
Trp	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Pro	Asn	Thr	Pro	Leu	Arg	
1835					1840					1845					
cca	aat	cag	caa	tct	gtg	ggt	aat	agt	tct	ttt	tca	gaa	ctt	ttt	5948
Pro	Asn	Gln	Gln	Ser	Val	Val	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Glu	Leu	Phe	
1850					1855					1860					
ggt	aaa	ttt	cta	gaa	aca	gaa	tct	cat	cca	tcc	att	cca	cca	cca	5993
Val	Lys	Phe	Leu	Glu	Thr	Glu	Ser	His	Pro	Ser	Ile	Pro	Pro	Pro	
1865					1870					1875					
aag	ctt	tct	ggt	cat	gat	atg	aaa	cct	ctg	gat	tca	cca	gga	aga	6038
Lys	Leu	Ser	Val	His	Asp	Met	Lys	Pro	Leu	Asp	Ser	Pro	Gly	Arg	
1880					1885					1890					
aga	aaa	aga	gat	aca	aat	gca	cca	gaa	agt	ttt	aaa	gat	aca	gca	6083
Arg	Lys	Arg	Asp	Thr	Asn	Ala	Pro	Glu	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	Ala	
1895					1900					1905					
gaa	tcc	agg	tct	ggt	aga	aga	aca	gat	gta	aat	ccg	ttt	ttg	gct	6128
Glu	Ser	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg	Thr	Asp	Val	Asn	Pro	Phe	Leu	Ala	
1910					1915					1920					
cct	cgc	tcg	gca	gct	gta	cct	ctt	att	aac	cca	gct	gga	ctt	gga	6173
Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Ile	Asn	Pro	Ala	Gly	Leu	Gly	
1925					1930					1935					

ES 2 605 646 T3

cct ggt ggg ccc ggg cat ctt ctt ctg aaa ccc atc tca gat gtt 6218  
 Pro Gly Gly Pro Gly His Leu Leu Leu Lys Pro Ile Ser Asp Val  
 1940 1945 1950

ttg ccc aca ttt aca cct ttg cca gcg tta cct gac aac agt gct 6263  
 Leu Pro Thr Phe Thr Pro Leu Pro Ala Leu Pro Asp Asn Ser Ala  
 1955 1960 1965

ggg gtt gtg ctg aaa gac ctt tta aag caa tag atgattctca 6306  
 Gly Val Val Leu Lys Asp Leu Leu Lys Gln  
 1970 1975

agccagagac aatctagcac tttaaagaaa ccatgaacac tatatgtatg tactttatca 6366

caaagtggcc tttggggaga aagtcattgta tttgttcgca attatgcttt ctctgaattt 6426

aataaaaata ttctaatgc ttttag 6452

<210> 47  
 <211> 1979  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 47

Met Ser Ser Trp Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Leu Gly Gln Ser Leu  
 1 5 10 15

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

Phe Thr Lys Asp Met Leu Met Glu Gly Thr Glu Glu Val Glu Ala Glu  
 35 40 45

Leu Pro Asp Ser Arg Thr Lys Glu Ile Glu Ala Ile His Ala Ile Leu  
 50 55 60

Arg Ser Glu Asn Glu Arg Leu Lys Lys Leu Cys Thr Asp Leu Glu Glu  
 65 70 75 80

Lys His Glu Ala Ser Glu Ile Gln Ile Lys Gln Gln Ser Thr Ser Tyr  
 85 90 95

Arg Asn Gln Leu Gln Gln Lys Glu Val Glu Ile Ser His Leu Lys Ala  
 100 105 110

Arg Gln Ile Ala Leu Gln Asp Gln Leu Leu Lys Leu Gln Ser Ala Ala  
 115 120 125

Gln Ser Val Pro Ser Gly Ala Gly Val Pro Ala Thr Thr Ala Ser Ser  
 130 135 140

10

ES 2 605 646 T3

Ser Phe Ala Tyr Gly Ile Ser His His Pro Ser Ala Phe His Asp Asp  
145 150 155 160

Asp Met Asp Phe Gly Asp Ile Ile Ser Ser Gln Gln Glu Ile Asn Arg  
165 170 175

Leu Ser Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Ser Glu Val Gly His Trp Arg  
180 185 190

His Ile Ala Gln Thr Ser Lys Ala Gln Gly Thr Asp Asn Ser Asp Gln  
195 200 205

Ser Glu Ile Cys Lys Leu Gln Asn Ile Ile Lys Glu Leu Lys Gln Asn  
210 215 220

Arg Ser Gln Glu Ile Asp Asp His Gln His Glu Met Ser Val Leu Gln  
225 230 235 240

Asn Ala His Gln Gln Lys Leu Thr Glu Ile Ser Arg Arg His Arg Glu  
245 250 255

Glu Leu Ser Asp Tyr Glu Glu Arg Ile Glu Glu Leu Glu Asn Leu Leu  
260 265 270

Gln Gln Gly Gly Ser Gly Val Ile Glu Thr Asp Leu Ser Lys Ile Tyr  
275 280 285

Glu Met Gln Lys Thr Ile Gln Val Leu Gln Ile Glu Lys Val Glu Ser  
290 295 300

Thr Lys Lys Met Glu Gln Leu Glu Asp Lys Ile Lys Asp Ile Asn Lys  
305 310 315 320

Lys Leu Ser Ser Ala Glu Asn Asp Arg Asp Ile Leu Arg Arg Glu Gln  
325 330 335

Glu Gln Leu Asn Val Glu Lys Arg Gln Ile Met Glu Glu Cys Glu Asn  
340 345 350

Leu Lys Leu Glu Cys Ser Lys Leu Gln Pro Ser Ala Val Lys Gln Ser  
355 360 365

Asp Thr Met Thr Glu Lys Glu Arg Ile Leu Ala Gln Ser Ala Ser Val  
370 375 380

ES 2 605 646 T3

Glu Glu Val Phe Arg Leu Gln Gln Ala Leu Ser Asp Ala Glu Asn Glu  
 385 390 395 400  
 Ile Met Arg Leu Ser Ser Leu Asn Gln Asp Asn Ser Leu Ala Glu Asp  
 405 410 415  
 Asn Leu Lys Leu Lys Met Arg Ile Glu Val Leu Glu Lys Glu Lys Ser  
 420 425 430  
 Leu Leu Ser Gln Glu Lys Glu Glu Leu Gln Met Ser Leu Leu Lys Leu  
 435 440 445  
 Asn Asn Glu Tyr Glu Val Ile Lys Ser Thr Ala Thr Arg Asp Ile Ser  
 450 455 460  
 Leu Asp Ser Glu Leu His Asp Leu Arg Leu Asn Leu Glu Ala Lys Glu  
 465 470 475 480  
 Gln Glu Leu Asn Gln Ser Ile Ser Glu Lys Glu Thr Leu Ile Ala Glu  
 485 490 495  
 Ile Glu Glu Leu Asp Arg Gln Asn Gln Glu Ala Thr Lys His Met Ile  
 500 505 510  
 Leu Ile Lys Asp Gln Leu Ser Lys Gln Gln Asn Glu Gly Asp Ser Ile  
 515 520 525  
 Ile Ser Lys Leu Lys Gln Asp Leu Asn Asp Glu Lys Lys Arg Val His  
 530 535 540  
 Gln Leu Glu Asp Asp Lys Met Asp Ile Thr Lys Glu Leu Asp Val Gln  
 545 550 555 560  
 Lys Glu Lys Leu Ile Gln Ser Glu Val Ala Leu Asn Asp Leu His Leu  
 565 570 575  
 Thr Lys Gln Lys Leu Glu Asp Lys Val Glu Asn Leu Val Asp Gln Leu  
 580 585 590  
 Asn Lys Ser Gln Glu Ser Asn Val Ser Ile Gln Lys Glu Asn Leu Glu  
 595 600 605  
 Leu Lys Glu His Ile Arg Gln Asn Glu Glu Glu Leu Ser Arg Ile Arg  
 610 615 620

ES 2 605 646 T3

Asn Glu Leu Met Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Asn Ser Asn Phe Lys  
 625 630 635 640

Asp Thr Leu Leu Lys Glu Arg Glu Ala Glu Val Arg Asn Leu Lys Gln  
 645 650 655

Asn Leu Ser Glu Leu Glu Gln Leu Asn Glu Asn Leu Lys Lys Val Ala  
 660 665 670

Phe Asp Val Lys Met Glu Asn Glu Lys Leu Val Leu Ala Cys Glu Asp  
 675 680 685

Val Arg His Gln Leu Glu Glu Cys Leu Ala Gly Asn Asn Gln Leu Ser  
 690 695 700

Leu Glu Lys Asn Thr Ile Val Glu Thr Leu Lys Met Glu Lys Gly Glu  
 705 710 715 720

Ile Glu Ala Glu Leu Cys Trp Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Glu Ala  
 725 730 735

Asn Lys Tyr Glu Lys Thr Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ala Arg Asn Leu  
 740 745 750

Asn Thr Ser Ala Leu Gln Leu Glu His Glu His Leu Ile Lys Leu Asn  
 755 760 765

Gln Lys Lys Asp Met Glu Ile Ala Glu Leu Lys Lys Asn Ile Glu Gln  
 770 775 780

Met Asp Thr Asp His Lys Glu Thr Lys Asp Val Leu Ser Ser Ser Leu  
 785 790 795 800

Glu Glu Gln Lys Gln Leu Thr Gln Leu Ile Asn Lys Lys Glu Ile Phe  
 805 810 815

Ile Glu Lys Leu Lys Glu Arg Ser Ser Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asp  
 820 825 830

Lys Tyr Ser Gln Ala Leu Arg Lys Asn Glu Ile Leu Arg Gln Thr Ile  
 835 840 845

Glu Glu Lys Asp Arg Ser Leu Gly Ser Met Lys Glu Glu Asn Asn His  
 850 855 860

Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Glu Gln Ser Arg Thr Ala



ES 2 605 646 T3

His Leu Lys Thr Glu Tyr His Lys Met Met Asp Ile Val Ala Ala  
1115 1120 1125

Lys Glu Ala Ala Leu Ile Lys Leu Gln Asp Glu Asn Lys Lys Leu  
1130 1135 1140

Ser Thr Arg Phe Glu Ser Ser Gly Gln Asp Met Phe Arg Glu Thr  
1145 1150 1155

Ile Gln Asn Leu Ser Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Ile Glu Ile  
1160 1165 1170

Asp Ala Leu Ser Gln Lys Cys Gln Thr Leu Leu Ala Val Leu Gln  
1175 1180 1185

Thr Ser Ser Thr Gly Asn Glu Ala Gly Gly Val Asn Ser His Gln  
1190 1195 1200

Phe Glu Glu Leu Leu Gln Glu Arg Asp Lys Leu Lys Gln Gln Val  
1205 1210 1215

Lys Lys Met Glu Glu Trp Lys Gln Gln Val Met Thr Thr Val Gln  
1220 1225 1230

Asn Met Gln His Glu Ser Ala Gln Leu Gln Glu Glu Leu His Gln  
1235 1240 1245

Leu Gln Ala Gln Val Leu Val Asp Ser Asp Asn Asn Ser Lys Leu  
1250 1255 1260

Gln Val Asp Tyr Thr Gly Leu Ile Gln Ser Tyr Glu Gln Asn Glu  
1265 1270 1275

Thr Lys Leu Lys Asn Phe Gly Gln Glu Leu Ala Gln Val Gln His  
1280 1285 1290

Ser Ile Gly Gln Leu Cys Asn Thr Lys Asp Leu Leu Leu Gly Lys  
1295 1300 1305

Leu Asp Ile Ile Ser Pro Gln Leu Ser Ser Ala Ser Leu Leu Thr  
1310 1315 1320

Pro Gln Ser Ala Glu Cys Leu Arg Ala Ser Lys Ser Glu Val Leu  
1325 1330 1335

ES 2 605 646 T3

Ser Glu Ser Ser Glu Leu Leu Gln Gln Glu Leu Glu Glu Leu Arg  
1340 1345 1350

Lys Ser Leu Gln Glu Lys Asp Ala Thr Ile Arg Thr Leu Gln Glu  
1355 1360 1365

Asn Asn His Arg Leu Ser Asp Ser Ile Ala Ala Thr Ser Glu Leu  
1370 1375 1380

Glu Arg Lys Glu His Glu Gln Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Leu  
1385 1390 1395

Lys Glu Lys Gln Asp Val Leu Gln Lys Leu Leu Lys Glu Lys Asp  
1400 1405 1410

Leu Leu Ile Lys Ala Lys Ser Asp Gln Leu Leu Ser Ser Asn Glu  
1415 1420 1425

Asn Phe Thr Asn Lys Val Asn Glu Asn Glu Leu Leu Arg Gln Ala  
1430 1435 1440

Val Thr Asn Leu Lys Glu Arg Ile Leu Ile Leu Glu Met Asp Ile  
1445 1450 1455

Gly Lys Leu Lys Gly Glu Asn Glu Lys Ile Val Glu Thr Tyr Arg  
1460 1465 1470

Gly Lys Glu Thr Glu Tyr Gln Ala Leu Gln Glu Thr Asn Met Lys  
1475 1480 1485

Phe Ser Met Met Leu Arg Glu Lys Glu Phe Glu Cys His Ser Met  
1490 1495 1500

Lys Glu Lys Ala Leu Ala Phe Glu Gln Leu Leu Lys Glu Lys Glu  
1505 1510 1515

Gln Gly Lys Thr Gly Glu Leu Asn Gln Leu Leu Asn Ala Val Lys  
1520 1525 1530

Ser Met Gln Glu Lys Thr Val Val Phe Gln Gln Glu Arg Asp Gln  
1535 1540 1545

Val Met Leu Ala Leu Lys Gln Lys Gln Met Glu Asn Thr Ala Leu  
1550 1555 1560

ES 2 605 646 T3

Gln Asn Glu Val Gln Arg Leu Arg Asp Lys Glu Phe Arg Ser Asn  
1565 1570 1575

Gln Glu Leu Glu Arg Leu Arg Asn His Leu Leu Glu Ser Glu Asp  
1580 1585 1590

Ser Tyr Thr Arg Glu Ala Leu Ala Ala Glu Asp Arg Glu Ala Lys  
1595 1600 1605

Leu Arg Lys Lys Val Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Val Ser Ser  
1610 1615 1620

Ser Asn Ala Met Glu Asn Ala Ser His Gln Ala Ser Val Gln Val  
1625 1630 1635

Glu Ser Leu Gln Glu Gln Leu Asn Val Val Ser Lys Gln Arg Asp  
1640 1645 1650

Glu Thr Ala Leu Gln Leu Ser Val Ser Gln Glu Gln Val Lys Gln  
1655 1660 1665

Tyr Ala Leu Ser Leu Ala Asn Leu Gln Met Val Leu Glu His Phe  
1670 1675 1680

Gln Gln Glu Glu Lys Ala Met Tyr Ser Ala Glu Leu Glu Lys Gln  
1685 1690 1695

Lys Gln Leu Ile Ala Glu Trp Lys Lys Asn Ala Glu Asn Leu Glu  
1700 1705 1710

Gly Lys Val Ile Ser Leu Gln Glu Cys Leu Asp Glu Ala Asn Ala  
1715 1720 1725

Ala Leu Asp Ser Ala Ser Arg Leu Thr Glu Gln Leu Asp Val Lys  
1730 1735 1740

Glu Glu Gln Ile Glu Glu Leu Lys Arg Gln Asn Glu Leu Arg Gln  
1745 1750 1755

Glu Met Leu Asp Asp Val Gln Lys Lys Leu Met Ser Leu Ala Asn  
1760 1765 1770

Ser Ser Glu Gly Lys Val Asp Lys Val Leu Met Arg Asn Leu Phe  
1775 1780 1785

Ile Gly His Phe His Thr Pro Lys Asn Gln Arg His Glu Val Leu

ES 2 605 646 T3

1790		1795		1800
Arg Leu Met Gly Ser Ile Leu Gly Val Arg Arg Glu Glu Met Glu 1805		1810		1815
Gln Leu Phe His Asp Asp Gln Gly Ser Val Thr Arg Trp Met Thr 1820		1825		1830
Gly Trp Leu Gly Gly Gly Ser Lys Ser Val Pro Asn Thr Pro Leu 1835		1840		1845
Arg Pro Asn Gln Gln Ser Val Val Asn Ser Ser Phe Ser Glu Leu 1850		1855		1860
Phe Val Lys Phe Leu Glu Thr Glu Ser His Pro Ser Ile Pro Pro 1865		1870		1875
Pro Lys Leu Ser Val His Asp Met Lys Pro Leu Asp Ser Pro Gly 1880		1885		1890
Arg Arg Lys Arg Asp Thr Asn Ala Pro Glu Ser Phe Lys Asp Thr 1895		1900		1905
Ala Glu Ser Arg Ser Gly Arg Arg Thr Asp Val Asn Pro Phe Leu 1910		1915		1920
Ala Pro Arg Ser Ala Ala Val Pro Leu Ile Asn Pro Ala Gly Leu 1925		1930		1935
Gly Pro Gly Gly Pro Gly His Leu Leu Leu Lys Pro Ile Ser Asp 1940		1945		1950
Val Leu Pro Thr Phe Thr Pro Leu Pro Ala Leu Pro Asp Asn Ser 1955		1960		1965
Ala Gly Val Val Leu Lys Asp Leu Leu Lys Gln 1970		1975		

<210> 48  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> cebador

10

<400> 48  
 gaagctacaa agcacatg 18

ES 2 605 646 T3

	<210> 49	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 49	
10	tcctgtcttt cttcatgc	18
	<210> 50	
	<211> 23	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 50	
20	catatgtcag tgttcagaa tgc	23
	<210> 51	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 51	
	ggtacctact aacctctcag ttc	24
	<210> 52	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador	
	<400> 52	
	catatgtcag tactgcagaa tgc	23
45	<210> 53	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 53	
55	ggtacctttt attccttca ctaatc	26
	<210> 54	
	<211> 787	
	<212> PRT	
	<213> <i>Canis familiaris</i>	
60	<400> 54	

ES 2 605 646 T3

Met Ser Val Leu Gln Asn Ala His Gln Gln Lys Leu Thr Asp Ile Ser  
1 5 10 15

Arg Arg His Arg Glu Glu Leu Arg Asp Tyr Glu Glu Arg Ile Glu Glu  
20 25 30

Leu Glu Asn Leu Leu Glu Gln Gly Gly Ser Gly Ile Val Ile Pro Asp  
35 40 45

His Ser Lys Ile His Glu Met Gln Lys Thr Ile Gln Asn Leu Gln Thr  
50 55 60

Glu Lys Val Ala Ser Ile Lys Lys Ile Glu Glu Leu Glu Asp Lys Ile  
65 70 75 80

Lys Asp Ile Asp Lys Lys Leu Ser Ser Ala Glu Asn Asp Arg Asp Val  
85 90 95

Leu Arg Lys Glu Lys Glu Cys Leu Asn Val Glu Asn Arg Gln Ile Thr  
100 105 110

Glu Gln Cys Glu Ser Leu Lys Leu Glu Cys Lys Leu Gln His Asp Ala  
115 120 125

Glu Lys Gln Gly Asp Thr Val Thr Glu Lys Glu Arg Ile Leu Pro Gln  
130 135 140

Ser Thr Ser Val Glu Glu Glu Val Leu Lys Leu Gln Gln Ala Leu Ser  
145 150 155 160

Asp Ala Glu Asn Glu Ile Met Arg Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Asp Asn  
165 170 175

Ser Leu Thr Glu Asp Asn Leu Lys Leu Lys Met His Val Glu Phe Leu  
180 185 190

Glu Lys Gln Lys Ser Leu Leu Ser Gln Glu Lys Glu Glu Leu Gln Leu  
195 200 205

Ser Leu Leu Lys Leu Asn Asn Glu Tyr Glu Val Ile Lys Ser Thr Ala



ES 2 605 646 T3

Ser Asn Gln Met Ser Leu Glu Arg Asn Thr Ile Val Glu Ala Leu Lys  
465 470 475 480

Met Glu Lys Gly Gln Leu Glu Ala Glu Leu Ser Arg Ala Asp Gln Arg  
485 490 495

Leu Leu Glu Glu Ala Ser Lys Tyr Glu Gln Thr Ile Gln Glu Leu Ser  
500 505 510

Lys Ala Arg Asp Leu Arg Thr Ser Ala Leu Gln Leu Glu Gln Gln His  
515 520 525

Leu Met Lys Leu Ser Gln Glu Lys Asp Phe Glu Ile Ala Glu Leu Lys  
530 535 540

Lys Asn Ile Glu Gln Met Asp Thr Asp His Lys Glu Thr Lys Ala Ile  
545 550 555 560

Leu Ser Ser Ile Leu Glu Glu Gln Lys Gln Leu Thr Gln Leu Ile Ser  
565 570 575

Glu Lys Glu Ile Phe Ile Glu Lys Leu Lys Glu Arg Ser Ser Glu Leu  
580 585 590

Gln Glu Glu Leu Glu Lys Ser Thr Gln Ala Ser Arg Lys Ile Glu Ile  
595 600 605

Leu Lys Gln Thr Ile Glu Glu Lys Asp Arg Ser Leu Gly Ser Met Lys  
610 615 620

Glu Glu Asn Asn His Leu Lys Glu Glu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Gln  
625 630 635 640

Gln Ser Arg Ala Val Pro Val Val Glu Pro Lys Pro Leu Asp Ser Val  
645 650 655

Thr Glu Leu Glu Ser Glu Val Leu Gln Leu Asn Ile Val Lys Arg Asn  
660 665 670

Leu Glu Glu Glu Ile Lys Arg His Gln Lys Ile Ile Glu Asp Gln Asn  
675 680 685

Gln Ser Lys Met Gln Leu Leu Gln Ser Leu Glu Glu Gln Lys Lys Glu  
690 695 700

ES 2 605 646 T3

Met Asp Glu Phe Lys Cys Gln His Glu Gln Met Asn Val Thr His Thr  
705 710 715 720

Gln Leu Phe Leu Glu Lys Asp Glu Glu Ile Lys Asn Leu Gln Lys Thr  
725 730 735

Ile Glu Gln Ile Lys Thr Gln Trp His Glu Glu Arg Gln Asp Val Gln  
740 745 750

Met Glu Asn Ser Glu Phe Phe Gln Glu Thr Lys Val Gln Ser Leu Asn  
755 760 765

Leu Glu Asn Gly Ser Glu Lys His Asp Leu Ser Lys Ala Glu Thr Glu  
770 775 780

Arg Leu Val  
785

<210> 55  
<211> 788  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 55

ES 2 605 646 T3

Met Ser Val Leu Gln Asn Ala His Gln Gln Lys Leu Thr Glu Ile Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg His Arg Glu Glu Leu Ser Asp Tyr Glu Glu Arg Ile Glu Glu  
 20 25 30

Leu Glu Asn Leu Leu Gln Gln Gly Gly Ser Gly Val Ile Glu Thr Asp  
 35 40 45

Leu Ser Lys Ile Tyr Glu Met Gln Lys Thr Ile Gln Val Leu Gln Ile  
 50 55 60

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

Lys Asp Ile Asn Lys Lys Leu Ser Ser Ala Glu Asn Asp Arg Asp Ile  
 85 90 95

Leu Arg Arg Glu Gln Glu Gln Leu Asn Val Glu Lys Arg Gln Ile Met  
 100 105 110

Glu Glu Cys Glu Asn Leu Lys Leu Glu Cys Ser Lys Leu Gln Pro Ser

ES 2 605 646 T3

	115						120									125
Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	Met	Thr	Glu	Lys	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	
	130						135									140
Gln	Ser	Ala	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Leu	Gln	Gln	Ala	Leu	Ser	
145					150					155					160	
Asp	Ala	Glu	Asn	Glu	Ile	Met	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Gln	Asp	Asn	
				165					170					175		
Ser	Leu	Ala	Glu	Asp	Asn	Leu	Lys	Leu	Lys	Met	Arg	Ile	Glu	Val	Leu	
			180					185					190			
Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	Ser	Gln	Glu	Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Met	
		195					200					205				
Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Asn	Glu	Tyr	Glu	Val	Ile	Lys	Ser	Thr	Ala	
	210					215					220					
Thr	Arg	Asp	Ile	Ser	Leu	Asp	Ser	Glu	Leu	His	Asp	Leu	Arg	Leu	Asn	
225					230					235					240	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Gln	Glu	Leu	Asn	Gln	Ser	Ile	Ser	Glu	Lys	Glu	
				245					250					255		
Thr	Leu	Ile	Ala	Glu	Ile	Glu	Glu	Leu	Asp	Arg	Gln	Asn	Gln	Glu	Ala	
			260					265					270			
Thr	Lys	His	Met	Ile	Leu	Ile	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Lys	Gln	Gln	Asn	
		275					280					285				
Glu	Gly	Asp	Ser	Ile	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Gln	Asp	Leu	Asn	Asp	Glu	
	290					295					300					
Lys	Lys	Arg	Val	His	Gln	Leu	Glu	Asp	Asp	Lys	Met	Asp	Ile	Thr	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Leu	Asp	Val	Gln	Lys	Glu	Lys	Leu	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	Ala	Leu	
				325					330					335		
Asn	Asp	Leu	His	Leu	Thr	Lys	Gln	Lys	Leu	Glu	Asp	Lys	Val	Glu	Asn	
			340					345					350			
Leu	Val	Asp	Gln	Leu	Asn	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Asn	Val	Ser	Ile	Gln	
		355					360					365				

ES 2 605 646 T3

Lys Glu Asn Leu Glu Leu Lys Glu His Ile Arg Gln Asn Glu Glu Glu  
370 375 380

Leu Ser Arg Ile Arg Asn Glu Leu Met Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser  
385 390 395 400

Asn Ser Asn Phe Lys Asp Thr Leu Leu Lys Glu Arg Glu Ala Glu Val  
405 410 415

Arg Asn Leu Lys Gln Asn Leu Ser Glu Leu Glu Gln Leu Asn Glu Asn  
420 425 430

Leu Lys Lys Val Ala Phe Asp Val Lys Met Glu Asn Glu Lys Leu Val  
435 440 445

Leu Ala Cys Glu Asp Val Arg His Gln Leu Glu Glu Cys Leu Ala Gly  
450 455 460

Asn Asn Gln Leu Ser Leu Glu Lys Asn Thr Ile Val Glu Thr Leu Lys  
465 470 475 480

Met Glu Lys Gly Glu Ile Glu Ala Glu Leu Cys Trp Ala Lys Lys Arg  
485 490 495

Leu Leu Glu Glu Ala Asn Lys Tyr Glu Lys Thr Ile Glu Glu Leu Ser  
500 505 510

Asn Ala Arg Asn Leu Asn Thr Ser Ala Leu Gln Leu Glu His Glu His  
515 520 525

Leu Ile Lys Leu Asn Gln Lys Lys Asp Met Glu Ile Ala Glu Leu Lys  
530 535 540

Lys Asn Ile Glu Gln Met Asp Thr Asp His Lys Glu Thr Lys Asp Val  
545 550 555 560

Leu Ser Ser Ser Leu Glu Glu Gln Lys Gln Leu Thr Gln Leu Ile Asn  
565 570 575

Lys Lys Glu Ile Phe Ile Glu Lys Leu Lys Glu Arg Ser Ser Lys Leu  
580 585 590

Gln Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Ser Gln Ala Leu Arg Lys Asn Glu Ile  
595 600 605

ES 2 605 646 T3

Leu Arg Gln Thr Ile Glu Glu Lys Asp Arg Ser Leu Gly Ser Met Lys  
 610 615 620

Glu Glu Asn Asn His Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Glu  
 625 630 635 640

Gln Ser Arg Thr Ala Pro Val Ala Asp Pro Lys Thr Leu Asp Ser Val  
 645 650 655

Thr Glu Leu Ala Ser Glu Val Ser Gln Leu Asn Thr Ile Lys Glu His  
 660 665 670

Leu Glu Glu Glu Ile Lys His His Gln Lys Ile Ile Glu Asp Gln Asn  
 675 680 685

Gln Ser Lys Met Gln Leu Leu Gln Ser Leu Gln Glu Gln Lys Lys Glu  
 690 695 700

Met Asp Glu Phe Arg Tyr Gln His Glu Gln Met Asn Ala Thr His Thr  
 705 710 715 720

Gln Leu Phe Leu Glu Lys Asp Glu Glu Ile Lys Ser Leu Gln Lys Thr  
 725 730 735

Ile Glu Gln Ile Lys Thr Gln Leu His Glu Glu Arg Gln Asp Ile Gln  
 740 745 750

Thr Asp Asn Ser Asp Ile Phe Gln Glu Thr Lys Val Gln Ser Leu Asn  
 755 760 765

Ile Glu Asn Gly Ser Glu Lys His Asp Leu Ser Lys Ala Glu Thr Glu  
 770 775 780

Arg Leu Val Lys  
 785

5 <210> 56  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 56  
 gtcgacatgt cgtcctggct cggg 24

15 <210> 57  
 <211> 24  
 <212> ADN

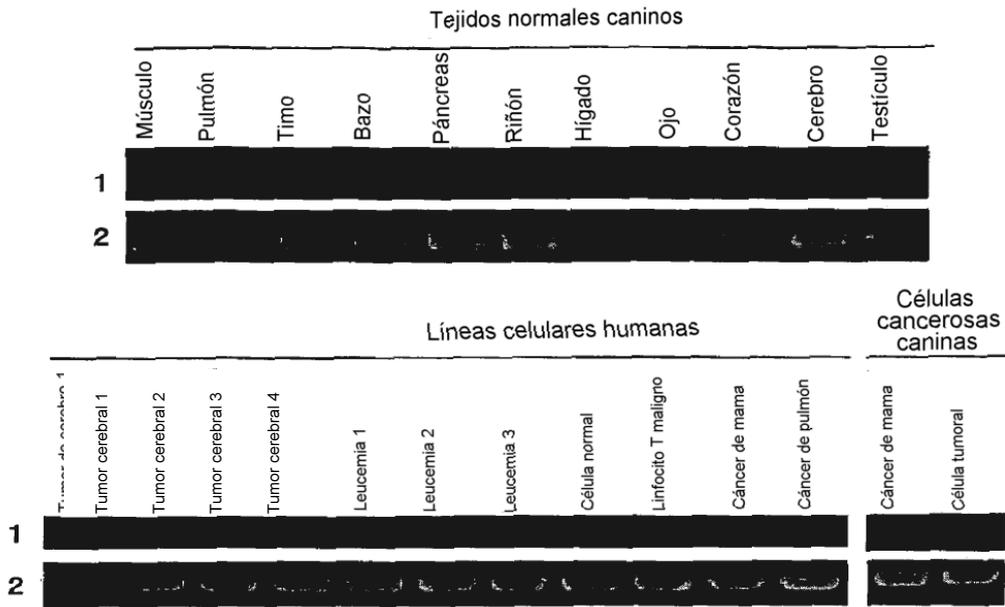
# ES 2 605 646 T3

<213> Artificial  
<220>  
<223> cebador  
5  
<400> 57  
ctcgagctat tgcttaaaa ggtc 24  
10  
<210> 58  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15  
<220>  
<223> cebador  
<400> 58  
catatgctgt cctggcttgg gggc 24  
20  
<210> 59  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial  
25  
<220>  
<223> cebador  
<400> 59  
ggtacctgc tttaaaggt cttc 25  
30

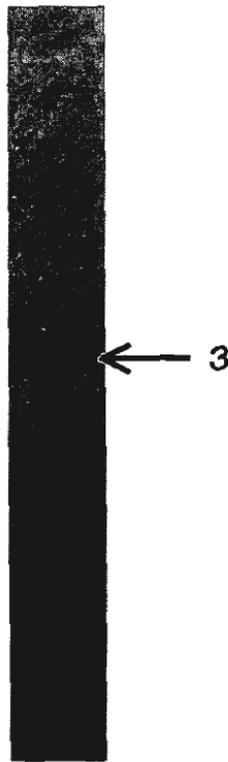
## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un cáncer (o cánceres) que se aplica a una muestra separada de un cuerpo vivo y que comprende medir una expresión de al menos un polipéptido, en el que el polipéptido:
- 5 (i) se produce en dicho cuerpo vivo;
- (ii) tiene reactividad para unirse a un anticuerpo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 2 o 4 mediante reacción antígeno-anticuerpo; y
- 10 (iii) tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o una homología de no menos del 95 % con la misma, en donde el término "homología" significa un valor expresado como un porcentaje que se calcula alineando dos secuencias de aminoácidos a comparar, de forma que el número de restos de aminoácidos que coinciden sea el máximo, y dividiendo el número de restos de aminoácidos que coinciden por el número total de restos de aminoácidos, contando cuando sea aplicable un hueco como un resto de aminoácido.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cuerpo vivo es un perro, un ser humano o un gato.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho cuerpo vivo es un perro y en el que dicho polipéptido a medir es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho cuerpo vivo es un ser humano y en el que dicho polipéptido a medir es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la medición de la expresión de dicho polipéptido (o polipéptidos) se lleva a cabo midiendo mediante inmunoensayo un anticuerpo que puede estar contenido en la muestra, induciéndose dicho anticuerpo en el cuerpo vivo frente a dicho polipéptido a medir.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, que se lleva a cabo mediante inmunoensayo utilizando como antígeno un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 2 o 4.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la medición de la expresión del polipéptido se lleva a cabo midiendo mediante inmunoensayo dicho polipéptido que puede estar contenido en la muestra.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra es un suero, un plasma, un ascitis o una efusión pleural.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la medición de la expresión del polipéptido se lleva a cabo midiendo el ARNm (o los ARNm) que codifica dicho polipéptido, cuyo ARNm (o cuyos ARNm) puede estar contenidos en la muestra.
- 40 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho cáncer es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en tumor cerebral; carcinomas de células escamosas de cabeza, cuello, pulmón, útero y esófago; adenocarcinomas de pulmón y útero; cáncer renal; tumor mixto maligno; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células basales; epulis acantomatoso; tumor intraoral; adenocarcinoma perianal; tumor de la glándula anal; carcinoma apocrino de la glándula anal; tumor de células de Sertoli; cáncer de vulva; adenocarcinoma sebáceo; epiteloma sebáceo; adenoma sebáceo; carcinoma de glándulas sudoríparas; adenocarcinoma intranasal; adenocarcinoma nasal; cáncer de tiroides; cáncer de colon; adenocarcinoma bronquial; adenocarcinoma; carcinoma ductal; adenocarcinoma mamario; adenocarcinoma mamario combinado; tumor mixto maligno de glándula mamaria; adenocarcinoma papilar intraductal; fibrosarcoma; hemangiopericitoma; osteosarcoma; condrosarcoma; sarcoma de tejidos blandos; sarcoma histiocítico; mixosarcoma; sarcoma indiferenciado; cáncer de pulmón; mastocitoma; liomioma cutáneo; liomioma intra abdominal; liomioma; leucemia linfocítica crónica; linfoma; linfoma gastrointestinal; linfoma de órganos digestivos; linfoma de células pequeñas o de células medianas; tumor adrenomedular; tumor de células de la granulosa; feocromocitoma; cáncer de vejiga (carcinoma de células transicionales); inflamación supurante; tumor de hígado intra abdominal; cáncer de hígado; plasmocitoma; hemangiopericitoma maligno; angiosarcoma; adenocarcinoma de la glándula anal; cáncer oral; melanoma maligno metastásico; melanoma maligno amelanico; melanoma maligno cutáneo; mioepitelioma maligno; seminoma maligno; seminoma; adenocarcinoma del intestino grueso; adenocarcinoma gástrico; carcinoma sebáceo de escasa malignidad; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma apocrino; carcinoma de glándulas sudoríparas apocrino poco diferenciado; histiocitoma fibroso maligno; mieloma múltiple; tumor maligno mesenquimatoso; liposarcoma; osteosarcoma; sarcoma de origen desconocido; sarcoma de partes blandas (tumor de células fusiformes); sarcoma poco diferenciado; sarcoma sinovial; angiosarcoma; epiteloma maligno metastásico; adenocarcinoma mamario tubular; carcinoma ductal mamario; cáncer de mama inflamatorio; germinoma; leucemia; tricoepitelioma invasivo; linfoma de células medianas; linfoma multicéntrico; osteosarcoma (glándula mamaria); mastocitoma (de tipo II según Patnaik); mastocitoma (de grado II) y liomiosarcoma.
- 65

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente detectar un grado de malignidad del cáncer basado en el nivel de expresión de uno cualquiera de los polipéptidos (a) a (d), en el que un nivel de expresión de dicho polipéptido más elevado indica un grado de malignidad más elevado.
- 5 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente detectar la fase de la evolución del cáncer basándose en el nivel de expresión del polipéptido, en donde un nivel de expresión de dicho polipéptido más elevado indica una fase más avanzada.
- 10 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende adicionalmente controlar un efecto del tratamiento de dicho cáncer (o cánceres) basándose en si el nivel de expresión del polipéptido disminuye o no.
14. Uso de un reactivo que comprende un polipéptido en un método *in vitro* para la detección de un cáncer (o cánceres), en el que el polipéptido:
- 15 (i) reacciona de forma inmunológica con un anticuerpo inducido en un cuerpo vivo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 2 o 4; y
- (ii) tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o una homología de no menos del 95 % con la misma, en donde el término "homología" significa un valor expresado como un porcentaje que se calcula alineando dos secuencias de aminoácidos a comparar, de forma que el número de restos de aminoácidos que coinciden sea el máximo, y dividiendo el número de restos de aminoácidos que coinciden por el número total de restos de aminoácidos, contando cuando sea aplicable un hueco como un resto de aminoácido.
- 20 15. Uso de un reactivo en un método *in vitro* para la detección de un cáncer (o cánceres), en el que el reactivo comprende:
- 25 (1) un anticuerpo que reacciona de forma inmunológica con un polipéptido, en donde el polipéptido:
- (i) se produce en un cuerpo vivo;
- 30 (ii) tiene reactividad para unirse a un anticuerpo frente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 2 o 4 mediante reacción antígeno-anticuerpo; y
- (iii) tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o una homología de no menos del 95 % con la misma, en donde el término "homología" significa un valor expresado como un porcentaje que se calcula alineando dos secuencias de aminoácidos a comparar, de forma que el número de restos de
- 35 aminoácidos que coinciden sea el máximo y dividiendo el número de restos de aminoácidos que coinciden por el número total de restos de aminoácidos, contando cuando sea aplicable un hueco como un resto de aminoácido,
- o bien
- 40 (2) un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de (1).



**Fig.1**



**Fig.2**

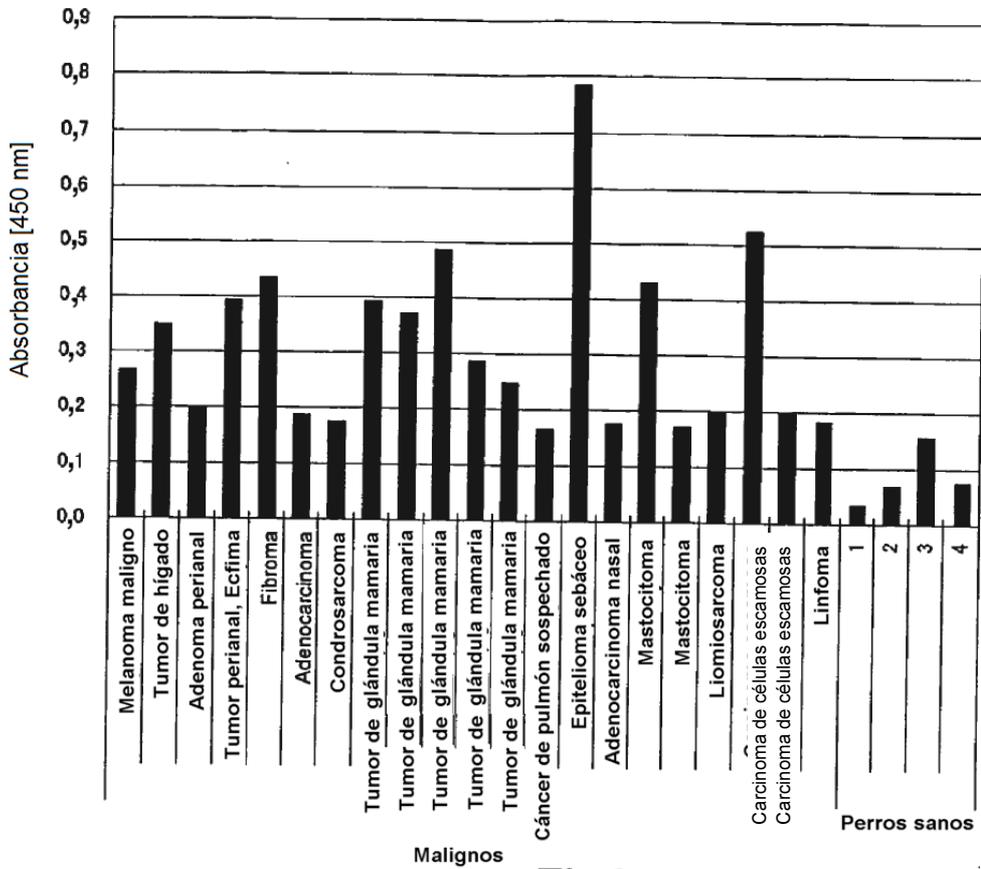


Fig.3

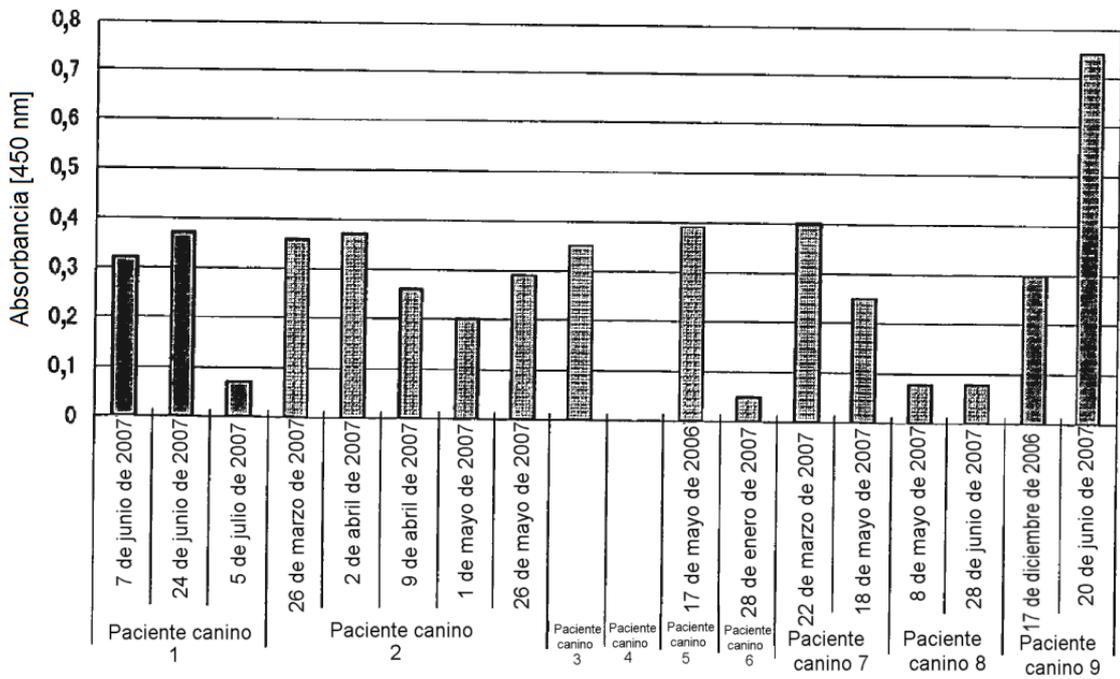


Fig.4

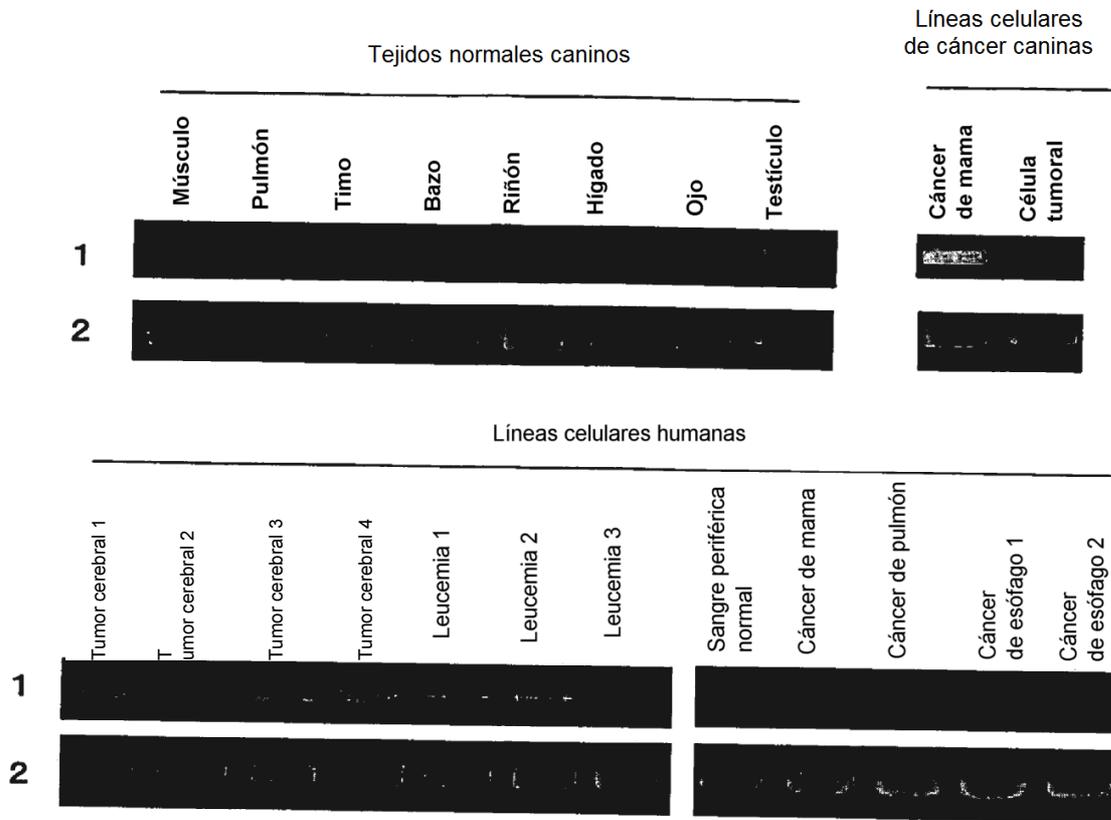
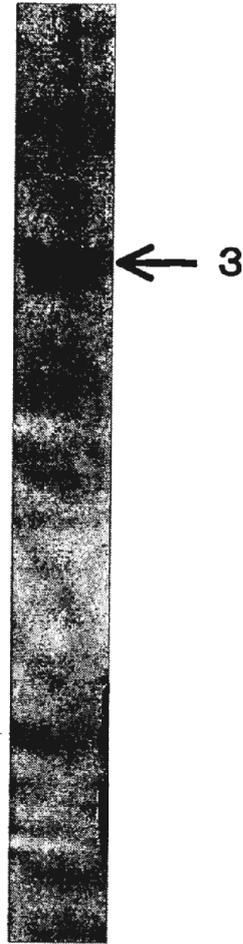


Fig.5



**Fig.6**

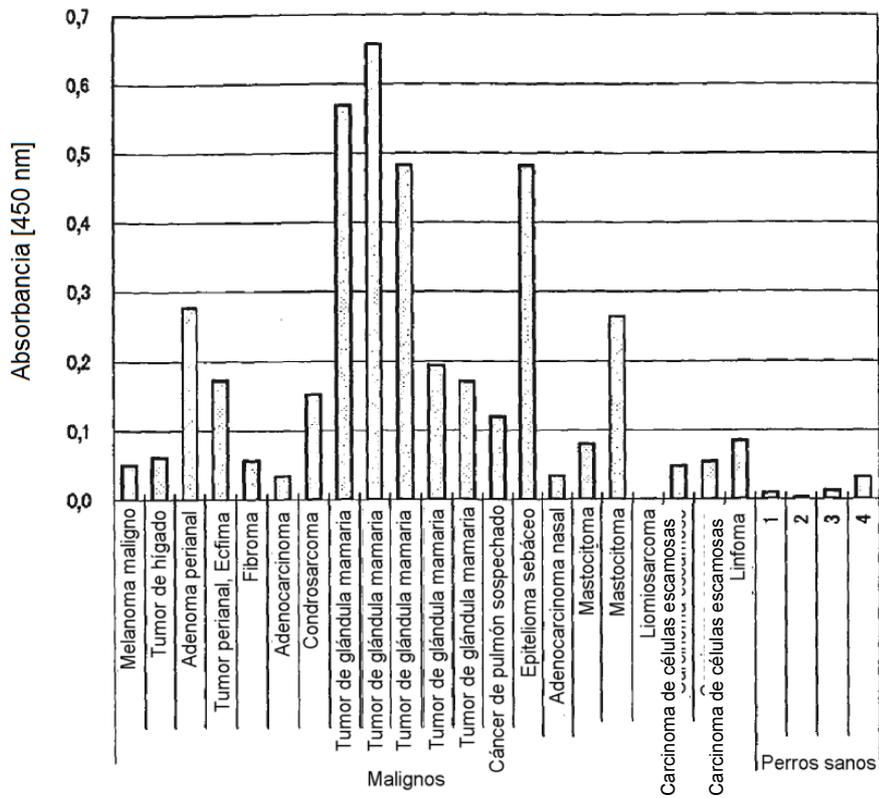


Fig.7

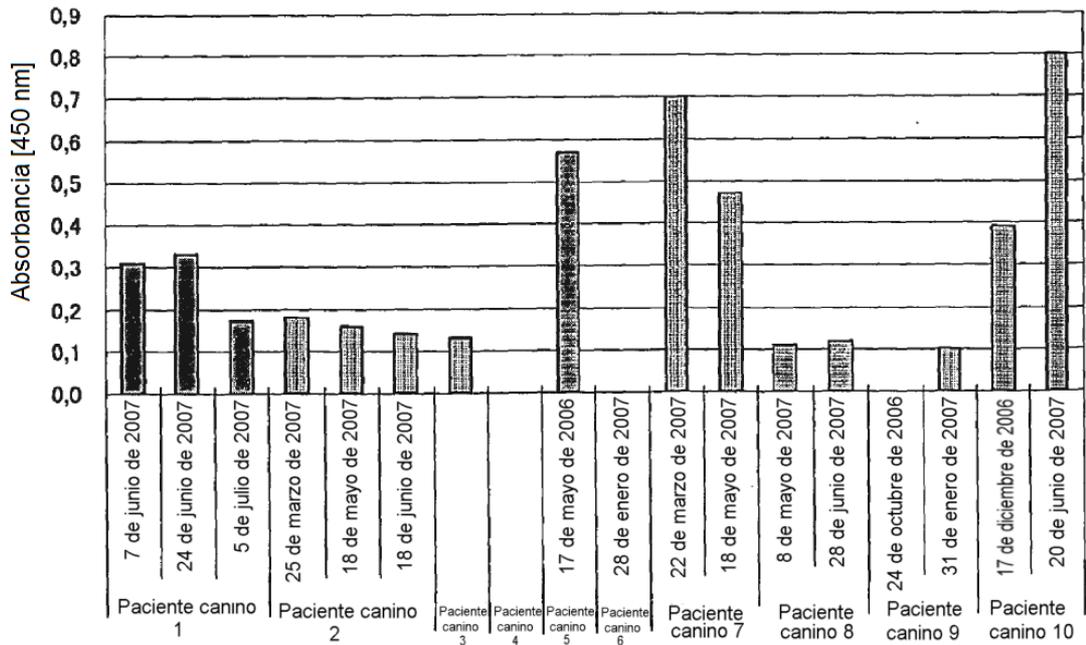


Fig.8

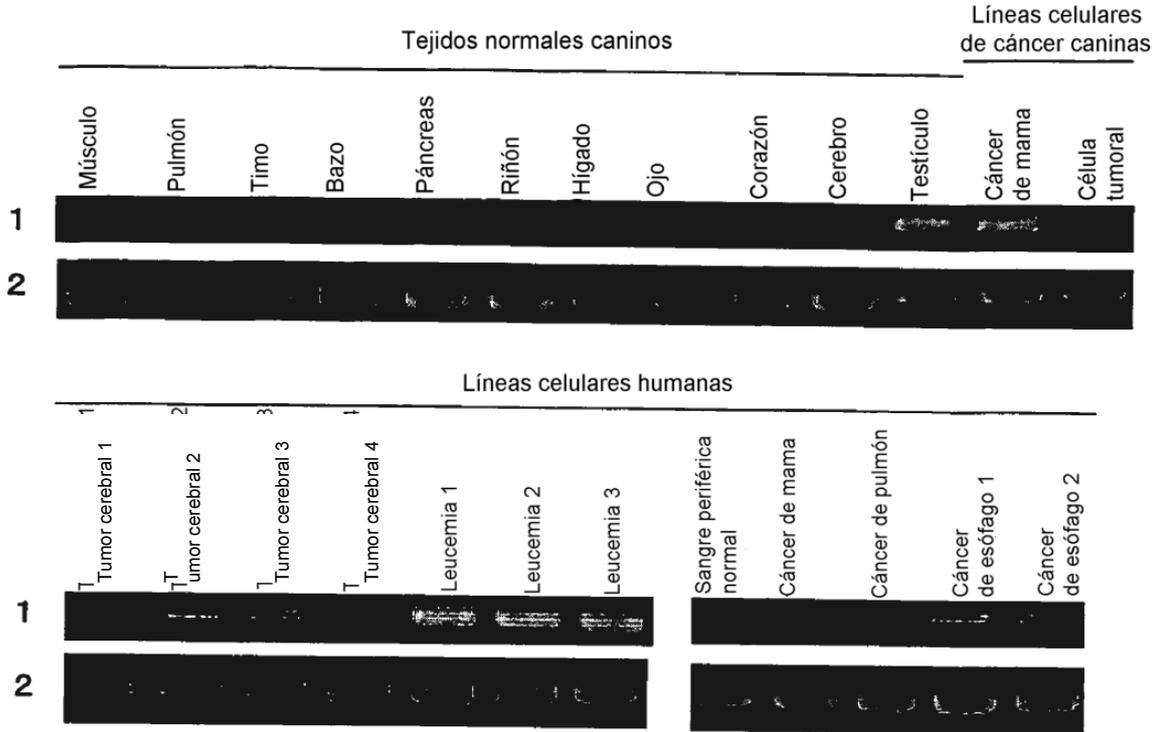


Fig.9

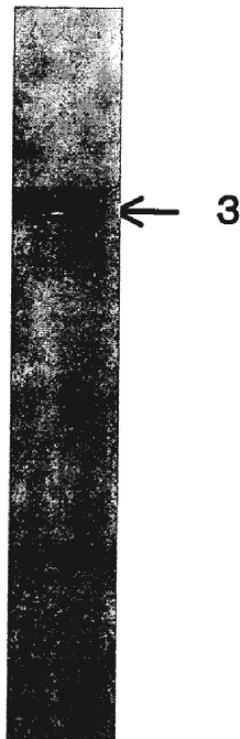


Fig.10

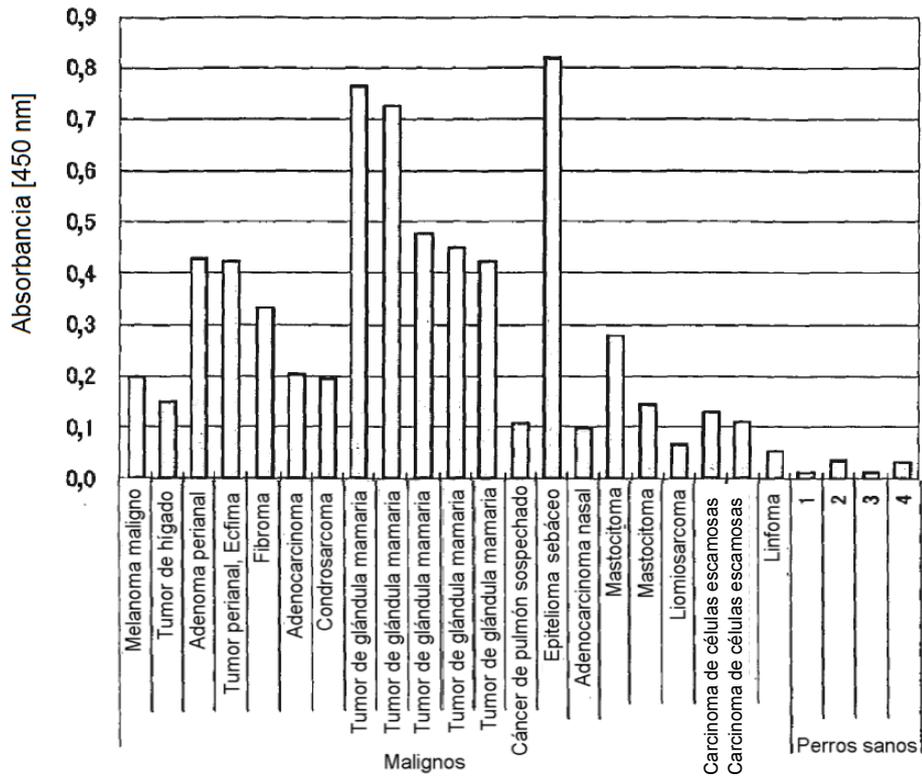


Fig.11

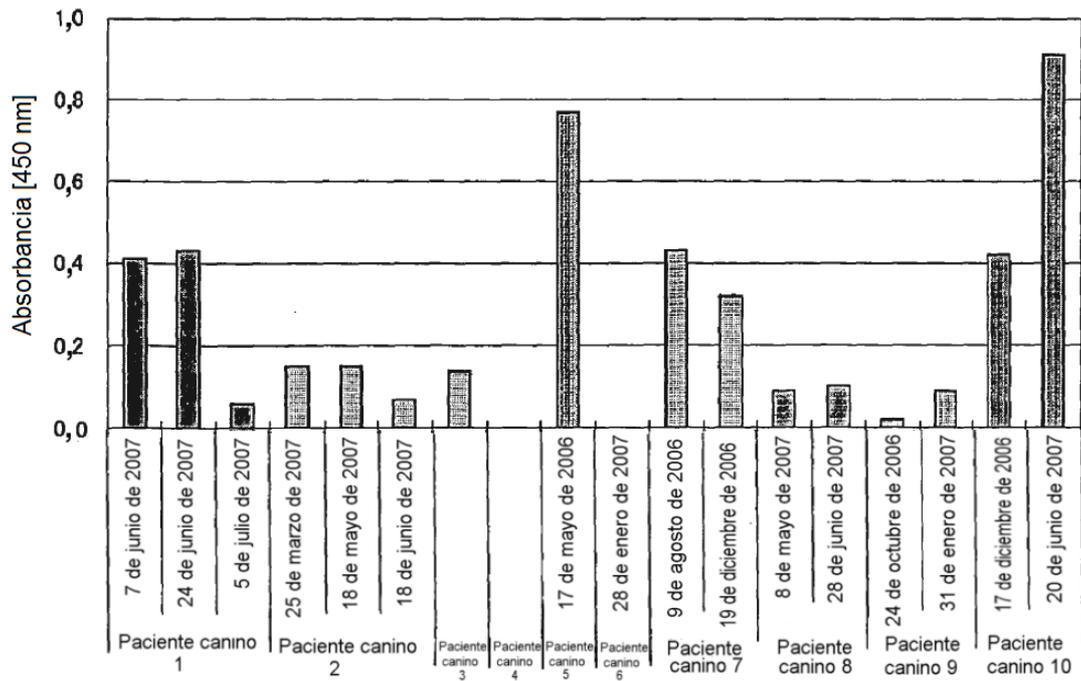


Fig.12

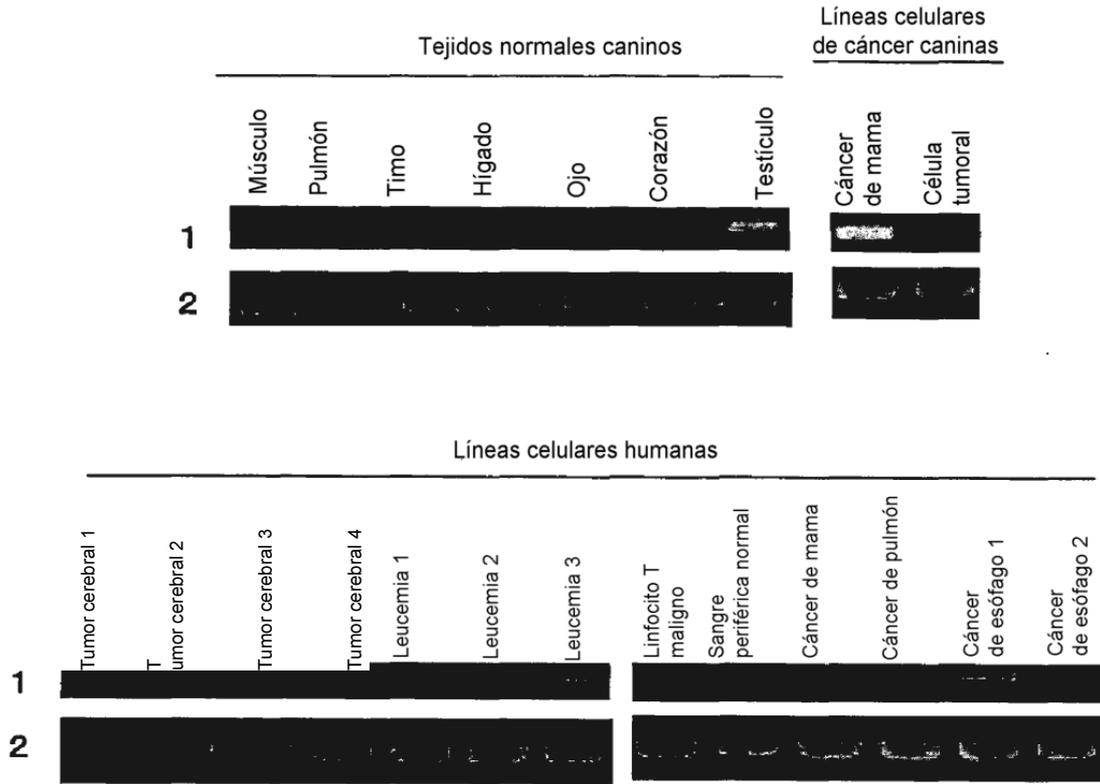


Fig.13

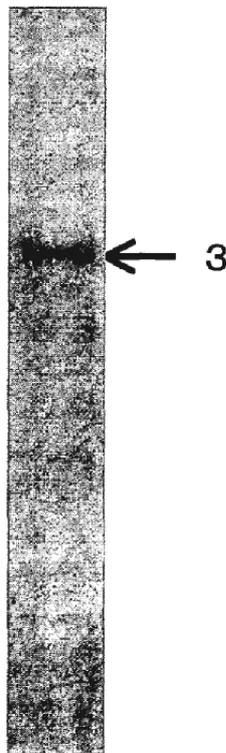


Fig.14

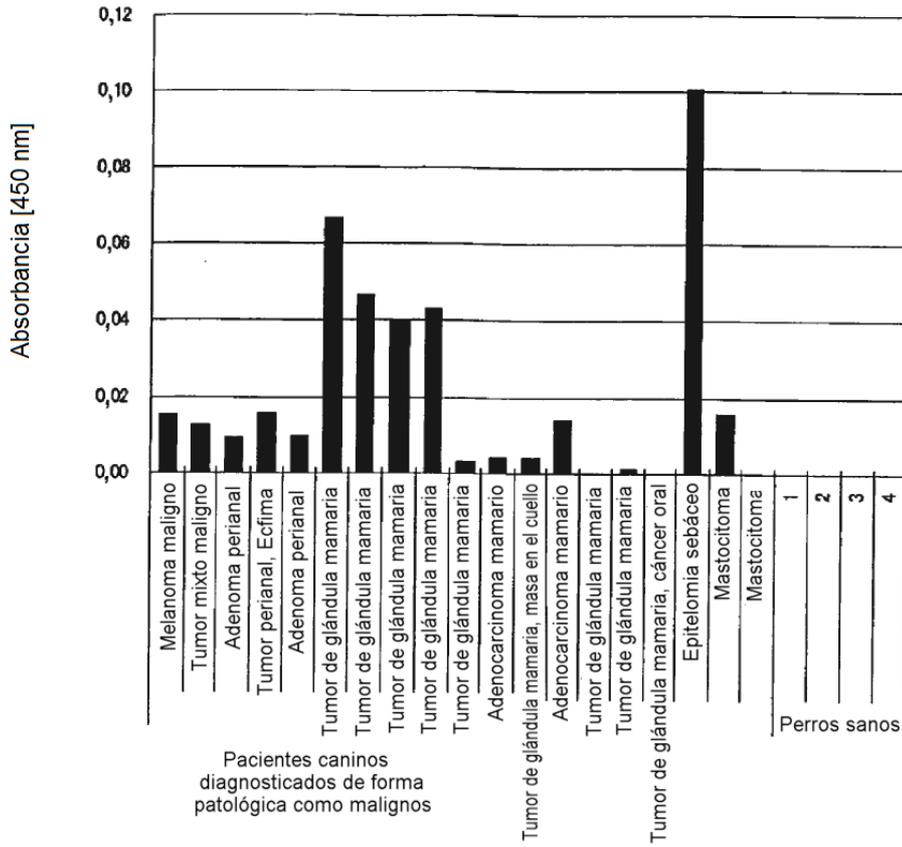


Fig.15

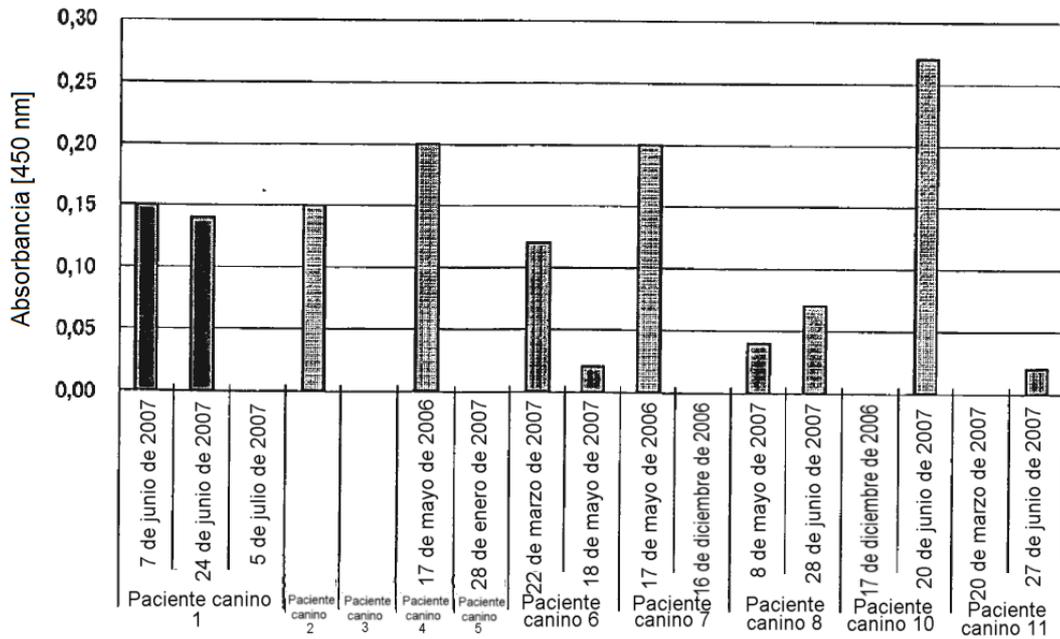


Fig.16