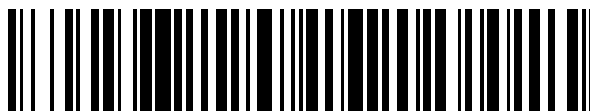


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 152**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008** **E 16181429 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020** **EP 3106874**

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:
20.10.2020

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 2 788 152 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
15 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.

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
20 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
25 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
40 no pueden encontrarse mediante ecografía, TC (tomografía computarizada) o RM (por resonancia magnética).

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,
45 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
50 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
55 reducir también la carga física y económica sobre el paciente. Por lo tanto, es importante que se pueda evaluar la fase de la evolución.

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
60 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,
65 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, completando de este modo la presente invención.

- 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 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 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 y se une mediante la reacción antígeno-anticuerpo a un anticuerpo inducido en un cuerpo vivo frente a una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, 28 o 42.

- 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 una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 26, 28 o 42, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La presente invención proporciona además un reactivo que comprende un anticuerpo que reacciona de forma inmunológica con una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:26, 28 o 42 mediante la reacción antígeno-anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método para la detección de un cáncer (o cánceres).

La presente invención aún proporciona además el uso tal como se define en las reivindicaciones, de un reactivo para la detección de un cáncer (o cánceres) que comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de no menos del 90 % con una región parcial que consiste en no menos de 18 bases consecutivas de la SEQ ID NO: 25, 27 o 41, o un polinucleótido que tiene una complementariedad de secuencia con la misma.

Efectos de la invención

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 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 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 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

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. 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.

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, producida en *E. coli* y purificado en el Ejemplo B. Número de referencia 3: la banda para la proteína calmegina canina.

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.

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.

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.

La Fig. 13 muestra el patrón de expresión del gen que codifica la proteína TRIP11 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 TRIP11 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 TRIP11 canina.

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.

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 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.

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

(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;

(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.

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 (c) 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 (c). Los cánceres se pueden detectar con una precisión más elevada cuando se miden dos o más polipéptidos, (véase el Ejemplo E a continuación).

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.

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 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).

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 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 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 espermatide, 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 espermatide (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 un “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.

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 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 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.

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 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.

El polipéptido descrito anteriormente (d), TRIP11 (proteína que interacciona con el receptor tiroideo 11), se identificó primero como un factor que interactúa con el receptor de la hormona tiroidea β 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 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 TRIP11 que tenga la secuencia de 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 TRIP11 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 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 TRIP11 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 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 humanos, 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 cánceres en los mamíferos midiendo la expresión del TRIP11 en mamíferos que no sean perros. Además del TRIP11 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 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 solo 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).

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 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 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:

- (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;
- (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.

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.

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, delecióna 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, deleciónado 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, deleciónados 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 aminoácidos 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 isoelectroenfoco; 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 β -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}I y ^3H . 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.

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')₂ 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 codifica al menos CEP de la SEQ ID NO: 26 o 42 o un factor homólogo de las mismas entre 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 TRIP11. 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 MgCl₂ 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_m del cebador o de la sonda, y de las reglas empíricas. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la temperatura apropiada.

5 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.

25 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_m 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 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 ± 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.

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.

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).

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.

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.

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.

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.

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 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 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.

Los cánceres a detectar mediante el método de la presente invención son los que expresan el CEP de la SEQ ID NO: 26 o 42 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 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; 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; hemangiopericitoma maligno; angiosarcoma; adenocarcinoma de la 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 las glándulas sebáceas 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) 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 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 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.

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 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.

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

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

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.

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.

(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') 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') 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 NaHCO₃ 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, MgClSO₄ 10 mM, Tris-HCl 50 mM, gelatina al 0,01 %; pH 7,5). La exploración se repitió como segunda y tercera exploración de la misma manera 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

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 DO₆₀₀ 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 DO₆₀₀ 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).

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/>). 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 10⁶ 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.

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.

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

5 (1) Preparación de la proteína recombinante

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 sometió al análisis de secuencia, cada uno de los dos tipos de cebadores que tenían los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I (descritos en las SEQ ID NO: 11 y 12) 0,4 µM, 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 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).

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 *Nde*I 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*, pET16b (fabricado por Novagen) que se había tratado con *Nde*I y *Xho*I. 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.

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 µl 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 µM, 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 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).

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.

50 (2) Purificación de la proteína recombinante

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 µg/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.

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.

El residuo se suspendió en hidrocloreuro 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: hidrocloreuro 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 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 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; 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. 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 inglete 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 solo dos ganglios linfáticos inflamados, se diagnosticó de forma clínica a este paciente como 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 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 metastásico. 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.

5 (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
10 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.

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.

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.

25 (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

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.

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.

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 con 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.

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.

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 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 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 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 (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 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 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)

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.

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.

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

(1) Preparación de la biblioteca de ADNc

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.

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 (fabricado 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

5 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 *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 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.

15 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 λ 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_3 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.

30 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 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 μ l de tampón SM (NaCl 100 mM, MgClSO_4 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.

40 (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 μ l de una solución preparada para contener una *E. coli* hospedadora (XL1-Blue MRF') de forma que la absorbancia DO_{600} debía ser de 1,0, con 100 μ l de una solución de fago purificado y adicionalmente con 1 μ 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 μ l de una solución preparada para contener un *E. coli* hospedador de fagémido (SOLR), de forma que la absorbancia DO_{600} debía ser de 1,0, con 10 μ 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 μ l de la mezcla de reacción en medio LB agar que contenía ampicilina (concentración final: 50 μ 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 μ 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).

60 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.

(4) Análisis de la expresión en cada tejido

- 5 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 10⁶ 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.

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

(1) Preparación de la proteína recombinante

- 40 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).

- 50 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.

- 60 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 *EcoRI* 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*, 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.

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 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.

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.

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.

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.

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.

5 (2)-1 Diagnóstico de tumores invisibles

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.

15 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.

20 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).

25 (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.

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.

(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 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.

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 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.

(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

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.

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

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 solo 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.

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.

(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.

(2)-8 Diagnóstico de malignidad del tumor recurrente

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.

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

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.

(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.

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.

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

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 10.000 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.

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.

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.

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.

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. 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.

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.

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)

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 proteína.

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, 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: 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 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.

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.

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

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.

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.

Ejemplo C-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 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.

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

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 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.

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 NaHCO_3 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+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 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_4 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') de forma que la absorbancia DO_{600} 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_{600} 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 5×10^6 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 SEQ 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).

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 *Sal*I, y se purificó utilizando el kit de extracción en 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. 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.

(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 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) (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, 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.

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

(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 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.

5 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)

10 (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.

25 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.

30 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.

55 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.

60 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 amelanótico, 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.

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.

(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 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.

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 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).

(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 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 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 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.

(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 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 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.

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.

5 (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 solo 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.

20 (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.

65 (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.

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.

(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: 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.

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.

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 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.

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.

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.

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)

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.

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 un 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.

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.

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.

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.

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)

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 BioScience) 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 NaHCO₃ 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, MgClSO₄ 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') de forma que la absorbancia a DO₆₀₀ 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 DO₆₀₀ 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 10⁶ 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

5

(1) Preparación de la proteína recombinante

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
10 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
15 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).

20 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).

25 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
30 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.

35 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
40 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
45 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
50 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
55 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
60 expresión de la proteína de interés.

(2) Purificación de las proteínas recombinantes

65 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.

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.

El residuo se suspendió en tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía hidrocloreuro de guanidinio (fabricado por Sigma Aldrich Japón) 6 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 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.

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

(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.

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.

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.

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).

5

(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.

10

(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.

15

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.

20

25

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.

30

35

40

45

(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.

50

55

60

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.

65

(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 solo 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 mamarios. 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 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

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.

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.

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.

(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.

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.

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.

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.

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.

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.

- 10 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 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. 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)

25 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 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 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 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 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 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 de cáncer.

Como resultado, se detectó el polipéptido en perros y gatos portadores de cáncer que padecían liomiasarcoma 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 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.

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.

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; epitelomocitoma 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.

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.

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

(1) Diagnóstico del cáncer en perros

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 ID 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.

(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 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.

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.

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

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.

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.

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

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 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
10 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 muestras de felinos sanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> TORAY INDUSTRIES, INC.

<120> Método para la detección de un cáncer

20 <130> PF382-PCT

<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

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	
145 150 155	

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

<210> 2
<211> 306

ES 2 788 152 T3

<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

<400> 2

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

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

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
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (103)..(1026)
<223>

<400> 3

```

gccgcagcca gcagcctgca gccgccgccg gggtgtgcct 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

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 Cys Glu Gln Cys Lys Gln Gln Cys Ala Phe Asp Arg Lys Asp Asp Arg 105 110 115	450
aag aag gta gat ggg aaa ttg ctg tgc tgg ctg tgc aca ctt tca tac Lys Lys Val Asp Gly Lys Leu Leu Cys Trp Leu Cys Thr Leu Ser Tyr 120 125 130	498
aaa cgg gtc ctt cag aag acc aaa gag cag agg aaa cac ctg agt agc Lys Arg Val Leu Gln Lys Thr Lys Glu Gln Arg Lys His Leu Ser Ser 135 140 145	546
tct tct cgt gct ggc cac cag gag aag gag cag tat agt cgc ctg agt Ser Ser Arg Ala Gly His Gln Glu Lys Glu Gln Tyr Ser Arg Leu Ser 150 155 160	594
ggt ggt ggc cat tat aac agc cag aaa aca ctt tct aca tct tca att Gly Gly Gly His Tyr Asn Ser Gln Lys Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ile 165 170 175 180	642
caa aat gaa atc cca aag aaa aag tcc aag ttt gag tca atc aca act Gln Asn Glu Ile Pro Lys Lys Lys Ser Lys Phe Glu Ser Ile Thr Thr 185 190 195	690
aat gga gac agc ttc tcc cca gac ctg gct ctg gac tca cca ggc act Asn Gly Asp Ser Phe Ser Pro Asp Leu Ala Leu Asp Ser Pro Gly Thr 200 205 210	738
gac cac ttt gtc atc att gcc caa ctg aag gaa gaa gtg gct acc ctg Asp His Phe Val Ile Ile Ala Gln Leu Lys Glu Glu Val Ala Thr Leu 215 220 225	786
aag aag atg ttg cat caa aag gat caa atg att tta gag aaa gag aag Lys Lys Met Leu His Gln Lys Asp Gln Met Ile Leu Glu Lys Glu Lys 230 235 240	834
aag att aca gag ttg aag gct gat ttt cag tac cag gaa tcg cag atg Lys Ile Thr Glu Leu Lys Ala Asp Phe Gln Tyr Gln Glu Ser Gln Met 245 250 255 260	882
aga gcc aaa atg aac cag atg gag aaa acc cac aaa gaa gtc aca gaa Arg Ala Lys Met Asn Gln Met Glu Lys Thr His Lys Glu Val Thr Glu 265 270 275	930
caa ctg cag gcc aaa aac cga gag ctc ctg aag cag gca gct gct ttg Gln Leu Gln Ala Lys Asn Arg Glu Leu Leu Lys Gln Ala Ala Ala Leu 280 285 290	978
tcc aag agc aag aag tca gag aag tca gga gct ata acc tct cca tga Ser Lys Ser Lys Lys Ser Glu Lys Ser Gly Ala Ile Thr Ser Pro 295 300 305	1026
cagacctcaa ggaggctccc tagcaacagc aaatggagtt gtccagggtt agggttggag	1086
acctggctgt tctgtgggaa ttgcaagctt tcttaagaaa tctctatttt attacagtta	1146
tccttctttg tgcgattgca gtgggctgaa tggaaacacc tggtttgtgc tgtgttagac	1206
tgcattgcttg agtggttggg atttcaagct cgctctcttt ctctcactat taggactttt	1266
ctttttcttc ttctctctct ctctattttg gttctattct tttttttct tttttctttt	1326
tttttttttt tttttttttg tgggtggtcac tgctcagtg aatgtgcaga atgatttggt	1386

```

ttttgttttt tttttttttt ttgtgtcctt cattgcatcc tgccataccc atgagcaaac 1446
agtttggcat taattatata tcaactgccac cctctgaact ttgaaaactg ccattcttcag 1506
acttggtata atggaagagg ctttctctct ccaataaacc ttttgcttca gggatatactc 1566
ttcggttttt ttccagatgt attatgtatg aactttgtac tatgtatagc cagagtttta 1626
tttatttttt aaaaaagaaa ctttttcttg ataaaggaat aatggtgggc tagctagttc 1686
ttgtaaaagt gatgcctctt gaaaaaaaaac agtcctattc actagctttt agtaaaagaa 1746
tcagatcttt tctttcttgt taccttggag tcttaaaaaac tgattgctaa ggtgaaacaa 1806
ttcaatgcat aagtatggag ctaagtgcct ttggaggat ttcttgggaag agcatttatg 1866
gagatactta agggaggtag caaagatttg aaccgtctgt ctttttaagt aagggcagaa 1926
agcaagggtt tccaggttgt actggacact tctctcccca cccctttcct gattgtttta 1986
tgtgattgat tttaaattct cacactgcc cttctttaaa 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

```

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 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

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

<220>
 <223> cebador

<400> 5
 aattaaccct cactaaaggg

20

<210> 6

	<211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador	
10	<400> 6 taatacgact cactatagg	19
15	<210> 7 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 7 agctgtgcaa ggaatgac	18
30	<210> 8 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 8 ccattagttg tgattgac	18
45	<210> 9 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador de GADPH	
55	<400> 9 gggctgctt taactctg	18
60	<210> 10 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador de GADPH	
	<400> 10 ccaggaaatg agcttgac	18
	<210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 11 atcatatggc ggcgctctac gc	22
	<210> 12	

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 12
 cgctcgagtg gagaagttat agctc 25
 10 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 20 gatatcatgg cggcgctcta cgc 23
 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 14
 gaattctcat ggagaggtta tagc 24
 <210> 15
 <211> 2326
 35 <212> ADN
 <213> *Canis familiaris*
 <220>
 <221> CDS
 40 <222> (62)..(1894)
 <223>
 <400> 15
 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
 45 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 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	
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 tgc gaa	1357
Ser Met Thr Ser Asn Ile Tyr Phe Asp Asn Phe Ile Ile Cys Ser Glu	
420 425 430	
aag gaa aca gca gat cgc tgg gct gca gat ggg tgg gga gtg aag ata	1405
Lys Glu Thr Ala Asp Arg Trp Ala Ala Asp Gly Trp Gly Val Lys Ile	
435 440 445	
ctg gta gca aat gct aac gag cct ggt ata ttt aaa cag tta atg gca	1453
Leu Val Ala Asn Ala Asn Glu Pro Gly Ile Phe Lys Gln Leu Met Ala	
450 455 460	
gct gct gaa gag cgc cca tgg ctt tgg ctc att tat ttt gtg aca gca	1501
Ala Ala Glu Glu Arg Pro Trp Leu Trp Leu Ile Tyr Phe Val Thr Ala	
465 470 475 480	
ggg ctt cca ata gca tta att gct tca ttt tgt tgg cca aga aaa gtc	1549
Gly Leu Pro Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Cys Trp Pro Arg Lys Val	
485 490 495	
aag aaa aaa tat gaa gat tca gag tat aaa aag act gac ata tgc aag	1597
Lys Lys Lys Tyr Glu Asp Ser Glu Tyr Lys Lys Thr Asp Ile Cys Lys	
500 505 510	
cca caa aca aag gga gca cta gag caa gaa gtg aag gaa aag aaa gct	1645
Pro Gln Thr Lys Gly Ala Leu Glu Gln Glu Val Lys Glu Lys Lys Ala	

515	520	525	
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 tot 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 agtatttttta attcctgagc gagatatttg Lys Glu 610			1934
gcattotaaa atcagtgtgc cagagctgaa ottgagtcag tctgcacatg tttctaatat			1994
ctagcaatgt tattcttttca gacacttatt ttagtctttc ttttcaggaa aaaaaaaact			2054
ttcaagttac ctggtctttg gatttagagt aaaaaagagg ggcatgttac gtatcagatt			2114
taagagacta ataccattag aagttaccaa gttttaatag ttggagaaag ttttggtttg			2174
tacagagaaa aataatatgc agcagctttg ctgctgttg aaaatcagtt attggaattt			2234
cccttaaac agctatacaa caatattact ggtagttcta taataaaaat gagagtgtgt			2294
tctgttgtag agagctaact gcaaaaaaaaa aa			2326

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

<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

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
 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
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (102)..(1934)
<223>

<400> 17

```

cgccggcgagg 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
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

```

15

gat	aaa	ccc	ttg	ata	gtt	caa	tat	gaa	gta	aat	ttt	caa	gat	ggg	att	548
Asp	Lys	Pro	Leu	Ile	Val	Gln	Tyr	Glu	Val	Asn	Phe	Gln	Asp	Gly	Ile	
	135					140					145					
gat	tgt	gga	ggg	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	
	150				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	
	230				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	
			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	ggg	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	

ES 2 788 152 T3

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 tgc 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 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
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
ccg 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

```

tcacctttga atttagaata aaagtggcac attacatatt ggatctaaga gattaataacc 2174
attagaagtt acacagtttt agttgtttgg agatagtttt ggtttgtaca gaacaaaata 2234
atatgtagca gcttcattgc tattggaaaa atcagttatt ggaatttcca cttaaatggc 2294
tatacaacaa tataactggg agttctataa taaaaatgag catatgttct gttgtgaaga 2354
gctaaatgca ataaagtttc tgtatgggtg ttgattcta tcaacaattg aaagtgttgt 2414
atatgaccca catttaccta gtttgtgtca aattatagtt acagtgagtt gtttgcttaa 2474
attatagatt cctttaagga catgccttgt tcataaaatc actggattat attgcagcat 2534
attttacatt tgaatacaag gataatgggt ttatcaaaa caaatgatg tacagatttt 2594
ttttcaagtt ttatagttg ctttatgcca gagtggttta cccattcac aaaatttctt 2654
atgcatacat tgctattgaa aataaaattt aaatattttt tcacctgaa aaaaaa 2710

```

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

<400> 18

ES 2 788 152 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
 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
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														

<210> 19
 <211> 18
 <212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 19 gtgatgaatc cagatgac	18
10	<210> 20 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 20 ggtcatagac caaagctc	18
25	<210> 21 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 21 aaggatccat gcatttcaa agc	23
40	<210> 22 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 22 ccgaattctt attccttcg tactc	25
55	<210> 23 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
65	<400> 23 gaattcatgc atttccaagc ctttg	26
	<210> 24 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 24 ctcgagttag tccttcgta ctc	23
	<210> 25 <211> 7353 <212> ADN	

<213> *Canis familiaris*

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(7020)

<223>

<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	
tca tct cac tct cct agt cca cca tcc ctt acg tcc aat atg aga tct	96
Ser Ser His Ser Pro Ser 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	
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	

10

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	
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 Ala Ala Gln Thr Arg Leu Ser Glu Leu His Asp Glu Ile Glu Lys Ala 450 455 460			1392
gaa caa caa att tta aga gcc act gaa gaa ttt aaa caa ctg gaa gaa Glu Gln Gln Ile Leu Arg Ala Thr Glu Glu Phe Lys Gln Leu Glu Glu 465 470 475 480			1440
gct ata caa ctt aaa aaa att tca gaa gcg gag aaa gac ctt ctt ttc Ala Ile Gln Leu Lys Lys Ile Ser Glu Ala Glu Lys Asp Leu Leu Phe 485 490 495			1488
aag cag ttg agt ggt agg ata cag ctt ctc aat aaa tta cgc caa gaa Lys Gln Leu Ser Gly Arg Ile Gln Leu Leu Asn Lys Leu Gln Glu 500 505 510			1536
gct gtg gat cta gaa aca cag atg gaa aag caa agg caa gaa att ggt Ala Val Asp Leu Glu Thr Gln Met Glu Lys Gln Arg Gln Glu Ile Gly 515 520 525			1584
gaa aag cag aat gag atc aag gac ctg gaa ata gtc aca gat agc ctg Glu Lys Gln Asn Glu Ile Lys Asp Leu Glu Ile Val Thr Asp Ser Leu 530 535 540			1632
gat tcc aga gac cca aaa cat tgc cat atg aag gct cag aaa aga ggt Asp Ser Arg Asp Pro Lys His Cys His Met Lys Ala Gln Lys Arg Gly 545 550 555 560			1680
aaa gaa caa caa ctt gac att atg aac aag cag tac aaa cag ctt gaa Lys Glu Gln Gln Leu Asp Ile Met Asn Lys Gln Tyr Lys Gln Leu Glu 565 570 575			1728
agc cgt ttg gat gag ata ctt tct aga att gcc aaa gaa act gaa gag Ser Arg Leu Asp Glu Ile Leu Ser Arg Ile Ala Lys Glu Thr Glu Glu 580 585 590			1776
att aag gac ctt gaa gaa cag ctt act gaa gga caa ata gcc gca aac Ile Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Thr Glu Gly Gln Ile Ala Ala Asn 595 600 605			1824
gaa gcc ctg aag aag gac tta gaa agt gtc atc agt ggg ttg caa gaa Glu Ala Leu Lys Lys Asp Leu Glu Ser Val Ile Ser Gly Leu Gln Glu 610 615 620			1872
tac ctg gag act gtc aaa ggt cag gcc cgt cag gcc cag aat gag tgc Tyr Leu Glu Thr Val Lys Gly Gln Ala Arg Gln Ala Gln Asn Glu Cys 625 630 635 640			1920
aga aag cta cag gat gag aag gag aca ttg ctg cag aga ttg agt gag Arg Lys Leu Gln Asp Glu Lys Glu Thr Leu Leu Gln Arg Leu Ser Glu 645 650 655			1968
gtc gag cag gag agg gac caa ctg gaa ata gtg gcc ata gat gca gaa Val Glu Gln Glu Arg Asp Gln Leu Glu Ile Val Ala Ile Asp Ala Glu 660 665 670			2016
aat atg agg aag gag ctc gca gaa ctg gag aat gcc ctc cag gag cag Asn Met Arg Lys Glu Leu Ala Glu Leu Glu Asn Ala Leu Gln Glu Gln 675 680 685			2064
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		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	toc	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 Lys Glu Arg Ile Leu Ala Gln Leu Arg Glu Leu Glu Lys Lys Lys Lys 945 950 955 960	2880
ctt gag gat gcc aag tct cag gag cag ttt ctt gga tta gat aga gaa Leu Glu Asp Ala Lys Ser Gln Glu Gln Phe Leu Gly Leu Asp Arg Glu 965 970 975	2928
ttg aag aag cta aag aaa gct gtg gct gcc tct gat aag ctg gcc aca Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Val Ala Ala Ser Asp Lys Leu Ala Thr 980 985 990	2976
gct gag ctc acc att gcc aaa gac cag ctc aag tcc ctt cat gga act Ala Glu Leu Thr Ile Ala Lys Asp Gln Leu Lys Ser Leu His Gly Thr 995 1000 1005	3024
gtg atg aaa att aac cag gag cga gca gag gag ctg cag gag acg Val Met Lys Ile Asn Gln Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gln Glu Thr 1010 1015 1020	3069
gag agg ttc agc aga aag gca gca caa gca gct agg gat ctg atc Glu Arg Phe Ser Arg Lys Ala Ala Gln Ala Ala Arg Asp Leu Ile 1025 1030 1035	3114
cga gca gaa gcg gag att gaa ctc ctg cag aag ctt ctc aga gat Arg Ala Glu Ala Glu Ile Glu Leu Leu Gln Lys Leu Leu Arg Asp 1040 1045 1050	3159
aaa gag gag cag ttt cga aat gag att gag aaa gta gat gtc ggc Lys Glu Glu Gln Phe Arg Asn Glu Ile Glu Lys Val Asp Val Gly 1055 1060 1065	3204
tct gga gga gca aag tca cag atg ctg gag atg gag aaa cta aat Ser Gly Gly Ala Lys Ser Gln Met Leu Glu Met Glu Lys Leu Asn 1070 1075 1080	3249
gag aca atg gag agg caa aga aca gag att gct agg ctg agg aat Glu Thr Met Glu Arg Gln Arg Thr Glu Ile Ala Arg Leu Arg Asn 1085 1090 1095	3294
tta cta gac ctc acc ggg gct gat aac aaa gga aac ttt gaa aat Leu Leu Asp Leu Thr Gly Ala Asp Asn Lys Gly Asn Phe Glu Asn 1100 1105 1110	3339
gtt ttg gaa gaa att gct gaa ctt cga cgt gaa gtt tct cat cag Val Leu Glu Glu Ile Ala Glu Leu Arg Arg Glu Val Ser His Gln 1115 1120 1125	3384
aat gat tac atc agc agc atg aca gat cct ttc aaa aga cga ggc Asn Asp Tyr Ile Ser Ser Met Thr Asp Pro Phe Lys Arg Arg Gly 1130 1135 1140	3429
tat tgg tac ttt atg cca cca cca tca tca tca aaa gtt tcc agc Tyr Trp Tyr Phe Met Pro Pro Pro Ser Ser Ser Lys Val Ser Ser 1145 1150 1155	3474
cac agt tcc cag gcc acc aag gac tct ggt gtt ggc cta aag tac His Ser Ser Gln Ala Thr Lys Asp Ser Gly Val Gly Leu Lys Tyr 1160 1165 1170	3519
aca gcc tcc act ccg gtt aga aaa cca cat cgt gga cgg cag gat Thr Ala Ser Thr Pro Val Arg Lys Pro His Arg Gly Arg Gln Asp 1175 1180 1185	3564

ES 2 788 152 T3

gga aag gag aac agt ggg cct cca cct gcc tca gga tac tgg gtg Gly Lys Glu Asn Ser Gly Pro Pro Pro Ala Ser Gly Tyr Trp Val 1190 1195 1200	3609
tat tct cct atc agg agt ggg tta cat aaa tcg ttc tca aat aga Tyr Ser Pro Ile Arg Ser Gly Leu His Lys Ser Phe Ser Asn Arg 1205 1210 1215	3654
gac gca gac agt gga gga gat agc cag gaa gag agc gag cta gat Asp Ala Asp Ser Gly Gly Asp Ser Gln Glu Glu Ser Glu Leu Asp 1220 1225 1230	3699
gac caa gaa gac cac cca ttt gta cct cct cct gga tac atg atg Asp Gln Glu Asp His Pro Phe Val Pro Pro Pro Gly Tyr Met Met 1235 1240 1245	3744
tac act gtg ttt cct gat ggt tct cct gta ccc cag ggc atg gcc Tyr Thr Val Phe Pro Asp Gly Ser Pro Val Pro Gln Gly Met Ala 1250 1255 1260	3789
ctg tat gca ccc cct cct ccc ttg ccc aac aat agc cag cct ctt Leu Tyr Ala Pro Pro Pro Pro Leu Pro Asn Asn Ser Gln Pro Leu 1265 1270 1275	3834
gac ctt ggc act gtt gtt tat ggc cca cct cct gtt ggg gct ccc Asp Leu Gly Thr Val Val Tyr Gly Pro Pro Pro Val Gly Ala Pro 1280 1285 1290	3879
atc gtg tat ggg cct cca cct ccc aac ttc tcc gta ccc ctc atc Ile Val Tyr Gly Pro Pro Pro Pro Asn Phe Ser Val Pro Leu Ile 1295 1300 1305	3924
ccc gtg ggt gtg ctg cac tgc aat gtc cca gaa cac cat aac ttg Pro Val Gly Val Leu His Cys Asn Val Pro Glu His His Asn Leu 1310 1315 1320	3969
gag aat gaa gtt tct aga tta gaa gac ata atg cag cat tta aaa Glu Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ile Met Gln His Leu Lys 1325 1330 1335	4014
tct ggg aaa cgg gaa cag tgc atg aaa aca ccc aag ctg cag tcg Ser Gly Lys Arg Glu Gln Cys Met Lys Thr Pro Lys Leu Gln Ser 1340 1345 1350	4059
gag aaa gaa ctc gca gag ctg cag cat aac att gat ggt ctt ttg Glu Lys Glu Leu Ala Glu Leu Gln His Asn Ile Asp Gly Leu Leu 1355 1360 1365	4104
caa gag aag aaa gac tta gag cat gaa gta gaa gaa tta cat aga Gln Glu Lys Lys Asp Leu Glu His Glu Val Glu Glu Leu His Arg 1370 1375 1380	4149
acc atc caa aaa cat caa cag cga aaa gat ttc att gat gga aac Thr Ile Gln Lys His Gln Gln Arg Lys Asp Phe Ile Asp Gly Asn 1385 1390 1395	4194
gtt gag agt ctt gtg aat gat cta gaa ata gag aag tca ctc aaa Val Glu Ser Leu Val Asn Asp Leu Glu Ile Glu Lys Ser Leu Lys 1400 1405 1410	4239
cac cat gaa gat att gtt gat gaa att gaa tgt att gag agg acc His His Glu Asp Ile Val Asp Glu Ile Glu Cys Ile Glu Arg Thr 1415 1420 1425	4284

ES 2 788 152 T3

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
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	
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 Arg Lys Asp Ala Leu Leu Ser Glu Gln Thr Arg Leu Glu Lys Asp 1895 1900 1905	5724
gtg ggt gaa tgg acg aag aag ttt gaa gac tgc cag aaa gaa ggg Val Gly Glu Trp Thr Lys Lys Phe Glu Asp Cys Gln Lys Glu Gly 1910 1915 1920	5769
gag aca aag cag caa cag ctt caa ggg ctt cag aag gag att gaa Glu Thr Lys Gln Gln Gln Leu Gln Gly Leu Gln Lys Glu Ile Glu 1925 1930 1935	5814
gga aac gag gcg aag cta gcc caa caa gaa atg atg ttt cag aga Gly Asn Glu Ala Lys Leu Ala Gln Gln Glu Met Met Phe Gln Arg 1940 1945 1950	5859
ctc cag aaa gag cga gaa tgt gaa gaa aaa aag tta gaa gct agt Leu Gln Lys Glu Arg Glu Cys Glu Glu Lys Lys Leu Glu Ala Ser 1955 1960 1965	5904
aaa gtg act ctg aag gag cag cag caa cag ctg gaa aag gaa ttg Lys Val Thr Leu Lys Glu Gln Gln Gln Glu Glu Lys Glu Leu 1970 1975 1980	5949
atg gag cag aaa ggc aag ctg gac cag gtg ctc gct aag ctc ttg Met Glu Gln Lys Gly Lys Leu Asp Gln Val Leu Ala Lys Leu Leu 1985 1990 1995	5994
gtg gct gag gag cgt gtc agg acc ttg cag gag gag gga agg tgg Val Ala Glu Glu Arg Val Arg Thr Leu Gln Glu Glu Gly Arg Trp 2000 2005 2010	6039
agc gag acc ctg gag aag acg ctc tcc cag acc aag cga cag ctt Ser Glu Thr Leu Glu Lys Thr Leu Ser Gln Thr Lys Arg Gln Leu 2015 2020 2025	6084
tca gaa cgg gag cag cag tta ctg gcc aag tca gac gag ctg ctg Ser Glu Arg Glu Gln Gln Leu Leu Ala Lys Ser Asp Glu Leu Leu 2030 2035 2040	6129
gcc ctg cag aag gag acg gac tcc atg agg gcg gac ttc agc ctc Ala Leu Gln Lys Glu Thr Asp Ser Met Arg Ala Asp Phe Ser Leu 2045 2050 2055	6174
ttg cgc aac cag ttc ctg aca gaa aga aag aaa gcc gag aag cag Leu Arg Asn Gln Phe Leu Thr Glu Arg Lys Lys Ala Glu Lys Gln 2060 2065 2070	6219
gtg gcc agc ctg aag gaa gcc ctt aag atc cag cgg agc caa ctg Val Ala Ser Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Gln Arg Ser Gln Leu 2075 2080 2085	6264
gag aag aac ctt ctg gag caa aag cag gag aac agc tgc atg cag Glu Lys Asn Leu Leu Glu Gln Lys Gln Glu Asn Ser Cys Met Gln 2090 2095 2100	6309
agg gag atg gca acc atc gaa cag gtg gcc cag gac aac cac gag Arg Glu Met Ala Thr Ile Glu Gln Val Ala Gln Asp Asn His Glu 2105 2110 2115	6354
cgg gcc cgg cgc cta atg agg gag ctc aac cag atg cag cgc gag Arg Ala Arg Arg Leu Met Arg Glu Leu Asn Gln Met Gln Arg Glu 2120 2125 2130	6399

ES 2 788 152 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 ggc 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 tgc cgc acc gag ggc tgc 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 tgc ccg cgg ctg gac gcg cac cga ccc tga ggacccggag	7030
Gly Pro Ser Pro Arg Leu Asp Ala His Arg Pro	
2330 2335	
gacccggagg cccggcgtcc cctcggaacg cttcctccgc gtccgcggac accaggetca	7090
cggaagggcg cgtccatgcg ggaagagccg cgagcggaac ccgatgcc gggtggtct	7150
ctgggccttg gaaacgtgtt gccgtaaaag cagcgcgccgc ggctgaggac ttgaagcccc	7210

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

<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			
Lys	Ser	Leu	Arg	Ile	Leu	Asn	Leu	Lys	Gly	Asn	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	

ES 2 788 152 T3

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		
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	
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
 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 T
 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		
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		

ES 2 788 152 T3

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			
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			

ES 2 788 152 T3

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
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			
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	2150	Asp Ala Met Gln Ala	2155	Leu Lys Cys
Glu Val Lys Asp Glu Ile Arg	2165	Thr Ser Leu Lys Asn	2170	Leu Asn Gln
Phe Leu Pro Glu Leu Pro Ala	2180	Asp Leu Glu Ala Leu	2185	Leu Glu Arg
Asn Glu Asn Leu Gly Gly Gly	2195	Leu Glu Ser Leu Lys	2200	Glu Asn Phe
Pro Phe Thr Val Ser Asp Arg	2210	Pro Ser Ser Cys Glu	2215	Glu Lys Leu
Asn Phe Gly Gln Ala His Val	2225	Ala Asp Glu Gln Trp	2230	Arg Gly Glu
Ala Leu Arg Glu Lys Leu Arg	2240	His Arg Glu Asp Arg	2245	Leu Lys Ala
Gln Leu Arg Arg Cys Met Ser	2255	Lys Gln Ala Glu Val	2260	Leu Ser Glu
Gly Arg Arg Arg Thr Glu Gly	2270	Thr Leu His Ser Leu	2275	Arg Arg Gln
Val Asp Ala Leu Gly Glu Leu	2285	Val Thr Ser Thr Ser	2290	Gly Asp Ser
Ala Ser Thr Arg Ser Leu Ser	2300	Arg Thr Glu Gly Ser	2305	Leu Ala Glu
Asp Glu Pro Pro Gly Pro Ser	2315	Gln Ser Ser Arg Arg	2320	Leu Pro Arg
Gly Pro Ser Pro Arg Leu Asp	2330	Ala His Arg Pro	2335	

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

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

<400> 27

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
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	
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 Glu Ala Gly Lys Asp Leu Leu Tyr Lys Gln Leu Ser Gly Arg Leu Gln 490 495 500	1540
ctt gta aat aaa tta cgc cag gaa gct ctg gat cta gaa ctg cag atg Leu Val Asn Lys Leu Arg Gln Glu Ala Leu Asp Leu Glu Leu Gln Met 505 510 515	1588
gaa aag caa aag cag gaa att gcc gga aag cag aag gag att aag gac Glu Lys Gln Lys Gln Glu Ile Ala Gly Lys Gln Lys Glu Ile Lys Asp 520 525 530 535	1636
ctg caa ata gcc ata gat agc ctg gat tcc aaa gac cca aaa cat tcc Leu Gln Ile Ala Ile Asp Ser Leu Asp Ser Lys Asp Pro Lys His Ser 540 545 550	1684
cat atg aag gct caa aag agc ggt aaa gaa caa cag ctt gac att atg His Met Lys Ala Gln Lys Ser Gly Lys Glu Gln Gln Leu Asp Ile Met 555 560 565	1732
aac aag cag tac caa caa ctt gaa agt cgt ttg gat gag ata ctt tct Asn Lys Gln Tyr Gln Gln Leu Glu Ser Arg Leu Asp Glu Ile Leu Ser 570 575 580	1780
aga att gct aag gaa acg gaa gag att aag gac ctt gaa gaa cag ctt Arg Ile Ala Lys Glu Thr Glu Glu Ile Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu 585 590 595	1828
act gaa ggc cag ata gca gca aat gaa gcc ctg aag aag gat tta gaa Thr Glu Gly Gln Ile Ala Ala Asn Glu Ala Leu Lys Lys Asp Leu Glu 600 605 610 615	1876
ggt gtt atc agt ggg ttg caa gaa tac ctg ggg acc att aaa ggc cag Gly Val Ile Ser Gly Leu Gln Glu Tyr Leu Gly Thr Ile Lys Gly Gln 620 625 630	1924
gca act cag gcc cag aat gag tgc agg aag ctg cgg gat gag aaa gag Ala Thr Gln Ala Gln Asn Glu Cys Arg Lys Leu Arg Asp Glu Lys Glu 635 640 645	1972
aca ttg ttg cag aga ttg aca gaa gtc gag cag gag aga gac cag ctg Thr Leu Leu Gln Arg Leu Thr Glu Val Glu Gln Glu Arg Asp Gln Leu 650 655 660	2020
gaa ata gtt gcc atg gat gca gaa aat atg agg aag gag ctt gca gag Glu Ile Val Ala Met Asp Ala Glu Asn Met Arg Lys Glu Leu Ala Glu 665 670 675	2068
cta gaa agt gcc ctc caa gag cag cat gag gtg aat gca tct ttg cag Leu Glu Ser Ala Leu Gln Glu Gln His Glu Val Asn Ala Ser Leu Gln 680 685 690 695	2116
cag acc cag gga gat ctc agt gcc tat gaa gct gag cta gag gct cgg Gln Thr Gln Gly Asp Leu Ser Ala Tyr Glu Ala Glu Leu Glu Ala Arg 700 705 710	2164
cta aac cta agg gat gct gaa gcc aac cag ctc aag gaa gag ttg gaa Leu Asn Leu Arg Asp Ala Glu Ala Asn Gln Leu Lys Glu Glu Leu Glu 715 720 725	2212
aaa gta aca aga ctt acc cag tta gaa caa tca gcc ctt caa gca gaa Lys Val Thr Arg Leu Thr Gln Leu Glu Gln Ser Ala Leu Gln Ala Glu 730 735 740 745	2260

730	735	740	
ctt gag aag gaa agg caa gcc ctc aag aat gcc ctt gga aaa gcc cag Leu Glu Lys Glu Arg Gln Ala Leu Lys Asn Ala Leu Gly Lys Ala Gln 745 750 755			2308
ttc tca gaa gaa aag gag caa gag aac agt gag ctc cat gca aaa ctt Phe Ser Glu Glu Lys Glu Gln Glu Asn Ser Glu Leu His Ala Lys Leu 760 765 770 775			2356
aaa cac ttg cag gat gac aat aat ctg tta aaa cag caa ctt aaa gat Lys His Leu Gln Asp Asp Asn Asn Leu Leu Lys Gln Gln Leu Lys Asp 780 785 790			2404
ttc cag aat cac ctt aac cat gtg gtt gat ggt ttg gtt cgt cca gaa Phe Gln Asn His Leu Asn His Val Val Asp Gly Leu Val Arg Pro Glu 795 800 805			2452
gaa gtg gca gct cgt gtg gat gag cta aga aga aaa ctg aaa tta gga Glu Val Ala Ala Arg Val Asp Glu Leu Arg Arg Lys Leu Lys Leu Gly 810 815 820			2500
act ggg gaa atg aac atc cat agt cct tca gat gtc tta ggg aaa agt Thr Gly Glu Met Asn Ile His Ser Pro Ser Asp Val Leu Gly Lys Ser 825 830 835			2548
ctt gct gat tta cag aaa caa ttc agt gaa att ctt gca cgc tcc aag Leu Ala Asp Leu Gln Lys Gln Phe Ser Glu Ile Leu Ala Arg Ser Lys 840 845 850 855			2596
tgg gaa aga gat gaa gca caa gtt aga gag aga aaa ctc caa gaa gaa Trp Glu Arg Asp Glu Ala Gln Val Arg Glu Arg Lys Leu Gln Glu Glu 860 865 870			2644
atg gct ctg cag caa gag aaa ctg gca act gga caa gaa gag ttc agg Met Ala Leu Gln Gln Glu Lys Leu Ala Thr Gly Gln Glu Phe Arg 875 880 885			2692
cag gcc tgt gag aga gcc ctg gaa gca aga atg aat ttt gat aag agg Gln Ala Cys Glu Arg Ala Leu Glu Ala Arg Met Asn Phe Asp Lys Arg 890 895 900			2740
caa cat gaa gca aga atc cag caa atg gag aat gaa att cac tat ttg Gln His Glu Ala Arg Ile Gln Gln Met Glu Asn Glu Ile His Tyr Leu 905 910 915			2788
caa gaa aat cta aaa agt atg gag gaa atc caa ggc ctt aca gat ctc Gln Glu Asn Leu Lys Ser Met Glu Glu Ile Gln Gly Leu Thr Asp Leu 920 925 930 935			2836
caa ctt cag gaa gct gat gaa gag aag gag aga att ctg gcc caa ctc Gln Leu Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys Glu Arg Ile Leu Ala Gln Leu 940 945 950			2884
cga gag tta gag aaa aag aag aaa ctt gaa gat gcc aaa tct cag gag Arg Glu Leu Glu Lys Lys Lys Lys Leu Glu Asp Ala Lys Ser Gln Glu 955 960 965			2932
caa gtt ttt ggt tta gat aaa gaa ctg aag aaa cta aag aaa gcc gtg Gln Val Phe Gly Leu Asp Lys Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Val 970 975 980			2980
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
Asn Lys Gly Gly Phe Glu Asn Val Leu Glu Glu Ile Ala Glu Leu	
1105	1110 1115
cga cgt gaa gtt tct tat cag aat gat tac ata agc agc atg gca	3433
Arg Arg Glu Val Ser Tyr Gln Asn Asp Tyr Ile Ser Ser Met Ala	
1120	1125 1130
gat cct ttc aaa aga cga ggc tat tgg tac ttt atg cca cca cca	3478
Asp Pro Phe Lys Arg Arg Gly Tyr Trp Tyr Phe Met Pro Pro Pro	
1135	1140 1145
cca tca tca aaa gtt tcc agc cat agt tcc cag gcc acc aag gac	3523
Pro Ser Ser Lys Val Ser Ser His Ser Ser Gln Ala Thr Lys Asp	
1150	1155 1160
tct ggt gtt ggc ctt aag tac tca gcc tca act cct gtt aga aaa	3568
Ser Gly Val Gly Leu Lys Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Arg Lys	
1165	1170 1175
cca cgc cct ggg cag cag gat ggg aag gaa ggc agt caa cct ccc	3613
Pro Arg Pro Gly Gln Gln Asp Gly Lys Glu Gly Ser Gln Pro Pro	
1180	1185 1190
cct gcc tca gga tac tgg gtt tat tct ccc atc agg agt ggg tta	3658
Pro Ala Ser Gly Tyr Trp Val Tyr Ser Pro Ile Arg Ser Gly Leu	
1195	1200 1205
cat aaa ctg ttt cca agt aga gat gca gac agt gga gga gat agt	3703
His Lys Leu Phe Pro Ser Arg Asp Ala Asp Ser Gly Gly Asp Ser	
1210	1215 1220

cag Gln 1225	gaa Glu	gag Glu	agt Ser	gag Glu	ctg Leu 1230	gat Asp	gac Asp	caa Gln	gaa Glu	gaa Glu 1235	ccc Pro	cca Pro	ttt Phe	gtg Val	3748
cct Pro 1240	cct Pro	cct Pro	gga Gly	tac Tyr	atg Met 1245	atg Met	tat Tyr	act Thr	gtg Val	ctt Leu 1250	cct Pro	gat Asp	ggt Gly	tct Ser	3793
cct Pro 1255	gta Val	ccc Pro	cag Gln	ggc Gly	atg Met 1260	gcc Ala	ctg Leu	tat Tyr	gca Ala	cca Pro 1265	cct Pro	cct Pro	ccc Pro	ttg Leu	3838
cca Pro 1270	aac Asn	aat Asn	agc Ser	cga Arg	cct Pro 1275	ctc Leu	acc Thr	cct Pro	ggc Gly	act Thr 1280	gtt Val	gtt Val	tat Tyr	ggc Gly	3883
cca Pro 1285	cct Pro	cct Pro	gct Ala	ggg Gly	gcc Ala 1290	ccc Pro	atg Met	gtg Val	tat Tyr	ggg Gly 1295	cct Pro	cca Pro	ccc Pro	ccc Pro	3928
aac Asn 1300	ttc Phe	tcc Ser	atc Ile	ccc Pro	ttc Phe 1305	atc Ile	cct Pro	atg Met	ggt Gly	gtg Val 1310	ctg Leu	cat His	tgc Cys	aac Asn	3973
gtc Val 1315	cct Pro	gaa Glu	cac His	cat His	aac Asn 1320	tta Leu	gag Glu	aat Asn	gaa Glu	gtt Val 1325	tct Ser	aga Arg	tta Leu	gaa Glu	4018
gac Asp 1330	ata Ile	atg Met	cag Gln	cat His	tta Leu 1335	aaa Lys	tca Ser	aag Lys	aag Lys	cgg Arg 1340	gaa Glu	gaa Glu	agg Arg	tgg Trp	4063
atg Met 1345	aga Arg	gca Ala	tcc Ser	aag Lys	cgg Arg 1350	cag Gln	tcg Ser	gag Glu	aaa Lys	gaa Glu 1355	atg Met	gaa Glu	gaa Glu	ctg Leu	4108
cat His 1360	cat His	aat Asn	att Ile	gat Asp	gat Asp 1365	ctt Leu	ttg Leu	caa Gln	gag Glu	aag Lys 1370	aaa Lys	agc Ser	tta Leu	gag Glu	4153
tgt Cys 1375	gaa Glu	gta Val	gaa Glu	gaa Glu	tta Leu 1380	cat His	aga Arg	act Thr	gtc Val	cag Gln 1385	aaa Lys	cgt Arg	caa Gln	cag Gln	4198
caa Gln 1390	aag Lys	gac Asp	ttc Phe	att Ile	gat Asp 1395	gga Gly	aat Asn	gtt Val	gag Glu	agt Ser 1400	ctt Leu	atg Met	act Thr	gaa Glu	4243
cta Leu 1405	gaa Glu	ata Ile	gaa Glu	aaa Lys	tca Ser 1410	ctc Leu	aaa Lys	cat His	cat His	gaa Glu 1415	gat Asp	att Ile	gta Val	gat Asp	4288
gaa Glu 1420	att Ile	gag Glu	tgc Cys	att Ile	gag Glu 1425	aag Lys	act Thr	ctt Leu	ctg Leu	aaa Lys 1430	cgt Arg	cgc Arg	tca Ser	gag Glu	4333
ctc Leu 1435	agg Arg	gaa Glu	gct Ala	gac Asp	cga Arg 1440	ctc Leu	ctg Leu	gca Ala	gag Glu	gct Ala 1445	gag Glu	agt Ser	gaa Glu	ctt Leu	4378
tca Ser 1450	tgc Cys	act Thr	aaa Lys	gaa Glu	aag Lys 1455	aca Thr	aaa Lys	aat Asn	gct Ala	gtt Val 1460	gaa Glu	aag Lys	ttc Phe	act Thr	4423

gat Asp 1465	gcc Ala 1465	aag Lys 1465	aga Arg 1465	agt Ser 1465	tta Leu 1470	ttg Leu 1470	caa Gln 1470	act Thr 1470	gag Glu 1475	tca Ser 1475	gat Asp 1475	gct Ala 1475	gag Glu 1475	gaa Glu 1475	4468
tta Leu 1480	gaa Glu 1480	agg Arg 1480	aga Arg 1480	gct Ala 1485	cag Gln 1485	gaa Glu 1485	act Thr 1485	gct Ala 1485	gtt Val 1490	aac Asn 1490	ctc Leu 1490	gtc Val 1490	aaa Lys 1490	gct Ala 1490	4513
gat Asp 1495	cag Gln 1495	cag Gln 1495	cta Leu 1495	aga Arg 1500	tcg Ser 1500	ctc Leu 1500	cag Gln 1500	gct Ala 1500	gat Asp 1505	gca Ala 1505	aag Lys 1505	gat Asp 1505	ttg Leu 1505	gag Glu 1505	4558
cag Gln 1510	cac His 1510	aaa Lys 1510	atc Ile 1510	aag Lys 1515	caa Gln 1515	gaa Glu 1515	gaa Glu 1515	atc Ile 1515	ttg Leu 1520	aaa Lys 1520	gaa Glu 1520	ata Ile 1520	aac Asn 1520	aaa Lys 1520	4603
att Ile 1525	gta Val 1525	gca Ala 1525	gca Ala 1525	aaa Lys 1530	gac Asp 1530	tca Ser 1530	gac Asp 1530	ttc Phe 1535	caa Gln 1535	tgt Cys 1535	tta Leu 1535	agc Ser 1535	aag Lys 1535	aag Lys 1535	4648
aag Lys 1540	gaa Glu 1540	aaa Lys 1540	ctg Leu 1540	aca Thr 1545	gaa Glu 1545	gag Glu 1545	ctt Leu 1545	cag Gln 1545	aaa Lys 1550	cta Leu 1550	cag Gln 1550	aaa Lys 1550	gac Asp 1550	ata Ile 1550	4693
gag Glu 1555	atg Met 1555	gca Ala 1555	gaa Glu 1555	cgc Arg 1560	aat Asn 1560	gag Glu 1560	gat Asp 1560	cac His 1565	cac His 1565	ctg Leu 1565	cag Gln 1565	gtc Val 1565	ctt Leu 1565	aaa Lys 1565	4738
gaa Glu 1570	tct Ser 1570	gag Glu 1570	gtg Val 1570	ctt Leu 1575	ctt Leu 1575	cag Gln 1575	gcc Ala 1575	aaa Lys 1580	aga Arg 1580	gcc Ala 1580	gag Glu 1580	ctg Leu 1580	gaa Glu 1580	aag Lys 1580	4783
ctg Leu 1585	aaa Lys 1585	agc Ser 1585	cag Gln 1585	gtg Val 1590	aca Thr 1590	agt Ser 1590	cag Gln 1590	cag Gln 1590	cag Gln 1595	gag Glu 1595	atg Met 1595	gct Ala 1595	gtc Val 1595	ttg Leu 1595	4828
gac Asp 1600	agg Arg 1600	cag Gln 1600	tta Leu 1600	ggg Gly 1605	cat His 1605	aaa Lys 1605	aag Lys 1605	gag Glu 1610	gag Glu 1610	ctg Leu 1610	cat His 1610	cta Leu 1610	ctc Leu 1610	caa Gln 1610	4873
gga Gly 1615	agc Ser 1615	atg Met 1615	gtc Val 1615	cag Gln 1620	gca Ala 1620	aaa Lys 1620	gct Ala 1625	gac Asp 1625	ctc Leu 1625	cag Gln 1625	gaa Glu 1625	gct Ala 1625	ctg Leu 1625	aga Arg 1625	4918
ctg Leu 1630	gga Gly 1630	gag Glu 1630	act Thr 1630	gaa Glu 1635	gta Val 1635	act Thr 1635	gag Glu 1635	aag Lys 1640	tgc Cys 1640	aat Asn 1640	cac His 1640	att Ile 1640	agg Arg 1640	gaa Glu 1640	4963
gta Val 1645	aaa Lys 1645	tct Ser 1645	ctt Leu 1645	ctg Leu 1650	gaa Glu 1650	gaa Glu 1650	ctg Leu 1650	agt Ser 1655	ttt Phe 1655	cag Gln 1655	aaa Lys 1655	gga Gly 1655	gaa Glu 1655	cta Leu 1655	5008
aat Asn 1660	gtt Val 1660	cag Gln 1660	att Ile 1660	agt Ser 1665	gaa Glu 1665	aga Arg 1665	aaa Lys 1665	act Thr 1670	caa Gln 1670	ctt Leu 1670	aca Thr 1670	ctt Leu 1670	ata Ile 1670	aag Lys 1670	5053
cag Gln 1675	gaa Glu 1675	att Ile 1675	gaa Glu 1675	aaa Lys 1680	gag Glu 1680	gaa Glu 1680	gaa Glu 1680	aat Asn 1685	ctt Leu 1685	cag Gln 1685	gtt Val 1685	gtt Val 1685	tta Leu 1685	agg Arg 1685	5098
cag Gln 5143	atg Met 5143	tct Ser 5143	aaa Lys 5143	cat His 5143	aaa Lys 5143	acc Thr 5143	gaa Glu 5143	cta Leu 5143	aag Lys 5143	aat Asn 5143	att Ile 5143	ctg Leu 5143	gac Asp 5143	atg Met 5143	5143

1690						1695						1700						
ttg	caa	ctt	gaa	aac	cat	gag	cta	caa	ggt	ttg	aag	cta	caa	cat	5188			
Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	His	Glu	Leu	Gln	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	His				
1705						1710						1715						
gac	caa	agg	gta	tct	gaa	tta	gag	aag	act	cag	gtg	gca	gtg	cta	5233			
Asp	Gln	Arg	Val	Ser	Glu	Leu	Glu	Lys	Thr	Gln	Val	Ala	Val	Leu				
1720						1725						1730						
gag	gag	aaa	ctg	gag	tta	gag	aat	ttg	cag	cag	ata	tcc	cag	cag	5278			
Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Gln	Ile	Ser	Gln	Gln				
1735						1740						1745						
cag	aaa	ggg	gaa	ata	gag	tgg	cag	aag	cag	ctc	ctt	gag	agg	gat	5323			
Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Glu	Trp	Gln	Lys	Gln	Leu	Leu	Glu	Arg	Asp				
1750						1755						1760						
aaa	cga	gaa	ata	gaa	cga	atg	act	gct	gag	tcc	cga	gct	tta	caa	5368			
Lys	Arg	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Thr	Ala	Glu	Ser	Arg	Ala	Leu	Gln				
1765						1770						1775						
tcg	tgt	gtt	gag	tgt	ttg	agc	aaa	gaa	aag	gaa	gat	ctc	caa	gag	5413			
Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Leu	Ser	Lys	Glu	Lys	Glu	Asp	Leu	Gln	Glu				
1780						1785						1790						
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	qtg	ctt	cag	aat	qag	att	qaa	qaa	aac	aaq	ctc	aaa	cta	qtc	5863			

Gln 1930	Val	Leu	Gln	Asn	Glu 1935	Ile	Glu	Glu	Asn	Lys 1940	Leu	Lys	Leu	Val	
caa 1945	caa	gaa	atg	atg	ttt 1950	cag	aga	ctc	cag	aaa 1955	gag	aga	gaa	agt	5908
Gln	Gln	Glu	Met	Met	Phe	Gln	Arg	Leu	Gln	Lys	Glu	Arg	Glu	Ser	
gaa 1960	gaa	agc	aaa	tta	gaa 1965	acc	agt	aaa	gtg	aca 1970	ctg	aag	gag	caa	5953
Glu	Glu	Ser	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Gln	
cag 1975	cac	cag	ctg	gaa	aag 1980	gaa	tta	aca	gac	cag 1985	aaa	agc	aaa	ctg	5998
Gln	His	Gln	Leu	Glu	Lys	Glu	Leu	Thr	Asp	Gln	Lys	Ser	Lys	Leu	
gac 1990	caa	gtg	ctc	tca	aag 1995	gtg	ctg	gca	gct	gaa 2000	gag	cgt	gtt	agg	6043
Asp	Gln	Val	Leu	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Ala	Glu	Glu	Arg	Val	Arg	
act 2005	ctg	cag	gaa	gag	gag 2010	agg	tgg	tgt	gag	agc 2015	ctg	gag	aag	aca	6088
Thr	Leu	Gln	Glu	Glu	Glu	Arg	Trp	Cys	Glu	Ser	Leu	Glu	Lys	Thr	
ctc 2020	tcc	caa	act	aaa	cgg 2025	cag	ctt	tca	gaa	agg 2030	gag	cag	caa	ttg	6133
Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Arg	Gln	Leu	Ser	Glu	Arg	Glu	Gln	Gln	Leu	
gtg 2035	gag	aaa	tca	ggt	gag 2040	ctg	ttg	gcc	ctc	cag 2045	aaa	gag	gca	gat	6178
Val	Glu	Lys	Ser	Gly	Glu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Ala	Asp	
tct 2050	atg	agg	gca	gac	ttc 2055	agc	ctt	ctg	cgg	aac 2060	cag	ttc	ttg	aca	6223
Ser	Met	Arg	Ala	Asp	Phe	Ser	Leu	Leu	Arg	Asn	Gln	Phe	Leu	Thr	
gaa 2065	aga	aag	aaa	gct	gag 2070	aag	cag	gtg	gcc	agc 2075	ctg	aag	gaa	gca	6268
Glu	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Gln	Val	Ala	Ser	Leu	Lys	Glu	Ala	
ctt 2080	aag	atc	cag	cgg	agc 2085	cag	ctg	gag	aaa	aac 2090	ctt	ctt	gag	caa	6313
Leu	Lys	Ile	Gln	Arg	Ser	Gln	Leu	Glu	Lys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gln	
aaa 2095	cag	gag	aac	agc	tgc 2100	ata	caa	aag	gaa	atg 2105	gca	aca	att	gaa	6358
Lys	Gln	Glu	Asn	Ser	Cys	Ile	Gln	Lys	Glu	Met	Ala	Thr	Ile	Glu	
ctg 2110	gta	gcc	cag	gac	aac 2115	cat	gag	cgg	gcc	agg 2120	cgc	ctg	atg	aag	6403
Leu	Val	Ala	Gln	Asp	Asn	His	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	Leu	Met	Lys	
gag 2125	ctc	aac	cag	atg	cag 2130	tat	gag	tac	acg	gag 2135	ctc	aag	aaa	cag	6448
Glu	Leu	Asn	Gln	Met	Gln	Tyr	Glu	Tyr	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Gln	
atg 2140	gca	aac	caa	aaa	gat 2145	ttg	gag	aga	aga	caa 2150	atg	gaa	atc	agt	6493
Met	Ala	Asn	Gln	Lys	Asp	Leu	Glu	Arg	Arg	Gln	Met	Glu	Ile	Ser	
gat 2155	gca	atg	agg	aca	ctt 2160	aaa	tct	gag	gtg	aag 2165	gat	gaa	atc	aga	6538
Asp	Ala	Met	Arg	Thr	Leu	Lys	Ser	Glu	Val	Lys	Asp	Glu	Ile	Arg	

acc	agc	ttg	aag	aat	ctt	aat	cag	ttt	ctt	cca	gaa	cta	cca	gca	6583
Thr	Ser	Leu	Lys	Asn	Leu	Asn	Gln	Phe	Leu	Pro	Glu	Leu	Pro	Ala	
2170					2175					2180					
gat	cta	gaa	gct	att	ttg	gaa	aga	aac	gaa	aac	cta	gaa	gga	gaa	6628
Asp	Leu	Glu	Ala	Ile	Leu	Glu	Arg	Asn	Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Glu	
2185					2190					2195					
ttg	gaa	agc	ttg	aaa	gag	aac	ctt	cca	ttt	acc	atg	aat	gag	gga	6673
Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Pro	Phe	Thr	Met	Asn	Glu	Gly	
2200					2205					2210					
cct	ttt	gaa	gaa	aaa	ctg	aac	ttt	tcc	caa	gtt	cac	ata	atg	gat	6718
Pro	Phe	Glu	Glu	Lys	Leu	Asn	Phe	Ser	Gln	Val	His	Ile	Met	Asp	
2215					2220					2225					
gaa	cac	tg	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	6763
Glu	His	Trp	Arg	Gly	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Lys	Leu	Arg	His	
2230					2235					2240					
gaa	gac	cga	ctc	aag	gcc	caa	ctc	cga	cac	tgt	atg	tcc	aag	caa	6808
Glu	Asp	Arg	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Arg	His	Cys	Met	Ser	Lys	Gln	
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	ctt	gtgtgtaaa	tatattcaag					7039
Lys	Asn	Ala	Ser	Ala	Arg										
2320					2325										
gaaaacacct	ccactacctc	actgacttca	taattggaat	gtcacatggt	ttttttaatc										7099
aagatgcagt	gaactgagat	tctgaaactc	cactgtagtt	tactttgcct	gtaccattaa										7159
tgccaatggt	tttataaatc	acttgtacat	agtacatatg	ggaatagttg	catatgggaa										7219
tttaaacc	catgtggctg	agcctttttt	tttttaaatc	tcgtaacatg	tttaaaaaaa										7279
aacagtgatt	ttaactgcat	atttgaacct	acaaactggg	aaatcttatt	aacaaaaaga										7339
atgtacttaa	ggccctcttt	atttatagtg	tcgagttatt	tttgaatttt	gcttaaaatc										7399
tatttttcat	atgaaaataa	aagataacaa	tc												7431

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

<400> 28

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	65	70	75	80
Arg	Tyr	Ile	Thr	Glu	Ala	Leu	Ile	Lys	Lys	Leu	Thr	Lys	Gln	Asp	Asn	85	90	95	
Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Gly	Gly	100	105	110	
Lys	Lys	Phe	Lys	Tyr	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	Leu	Asp	130	135	140	
Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Arg	Glu	Leu	Asn	Leu	Ser	Tyr	Asn	Lys	Ile	Ser	145	150	155	160
Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Glu	Asn	Met	Cys	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	Val	Leu	Asn	Leu	Lys	Gly	Asn	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	195	200	205	
Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Pro	Leu	Gln	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Ile	210	215	220	
Leu	Val	Glu	Asn	Pro	Val	Val	Thr	Leu	Pro	His	Tyr	Leu	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
 Thr Gln Asp Arg Gln Glu Ala Phe Glu Arg Phe Ser Leu Glu Glu Val
 260 265 270
 Glu Arg Leu Glu Arg Asp Leu Glu Lys Lys Met Ile Glu Thr Glu Glu
 275 280 285
 Leu Lys Ser Lys Gln Thr Arg Phe Leu Glu Glu Ile Lys Asn Gln Asp
 290 295 300
 Lys Leu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Glu Ala Met Leu Gln Lys Gln Ser
 305 310 315 320
 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

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
 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
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 1235	Pro Pro Phe Val 1240	Pro Pro Gly Tyr Met 1245	Met Tyr Thr
Val Leu 1250	Pro Asp Gly Ser Pro 1255	Val Pro Gln Gly Met 1260	Ala Leu Tyr
Ala Pro 1265	Pro Pro Pro Leu Pro 1270	Asn Asn Ser Arg Pro 1275	Leu Thr Pro
Gly Thr 1280	Val Val Tyr Gly Pro 1285	Pro Pro Ala Gly Ala 1290	Pro Met Val
Tyr Gly 1295	Pro Pro Pro Pro Asn 1300	Phe Ser Ile Pro Phe 1305	Ile Pro Met
Gly Val 1310	Leu His Cys Asn Val 1315	Pro Glu His His Asn 1320	Leu Glu Asn
Glu Val 1325	Ser Arg Leu Glu Asp 1330	Ile Met Gln His Leu 1335	Lys Ser Lys
Lys Arg 1340	Glu Glu Arg Trp Met 1345	Arg Ala Ser Lys Arg 1350	Gln Ser Glu
Lys Glu 1355	Met Glu Glu Leu His 1360	His Asn Ile Asp Asp 1365	Leu Leu Gln
Glu Lys 1370	Lys Ser Leu Glu Cys 1375	Glu Val Glu Glu Leu 1380	His Arg Thr
Val Gln 1385	Lys Arg Gln Gln Gln 1390	Lys Asp Phe Ile Asp 1395	Gly Asn Val
Glu Ser 1400	Leu Met Thr Glu Leu 1405	Glu Ile Glu Lys Ser 1410	Leu Lys His
His Glu 1415	Asp Ile Val Asp Glu 1420	Ile Glu Cys Ile Glu 1425	Lys Thr Leu
Leu Lys 1430	Arg Arg Ser Glu Leu 1435	Arg Glu Ala Asp Arg 1440	Leu Leu Ala
Glu Ala 1445	Glu Ser Glu Leu Ser 1450	Cys Thr Lys Glu Lys 1455	Thr Lys Asn
Ala Val 1460	Glu Lys Phe Thr Asp 1465	Ala Lys Arg Ser Leu 1470	Leu Gln Thr

ES 2 788 152 T3

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

Leu Pro	Glu Leu Pro Ala Asp	Leu Glu Ala Ile Leu	Glu Arg Asn
2180	2185	2190	
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	

<210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 29
 gcagcaaaag actcagac

18

<210> 30
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 30
 aagttgcaac atgtccag

18

<210> 31
 <211> 28

ES 2 788 152 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 31	
	catatggagc aagaggaaat cttgaaag	28
10	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 32	
20	ggtaccgggt cggcgcggt c	21
	<210> 33	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 33	
30	ggatccatca agcaagaaga aatc	24
	<210> 34	
	<211> 25	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 34	
	gtcgactcat ctggctgagg cattc	25
	<210> 35	
	<211> 826	
45	<212> PRT	
	<213> <i>Canis familiaris</i>	
	<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	
50	20 25 30	

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

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

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

ES 2 788 152 T3

530		535		540
Leu Leu Arg Asn Gln Phe Leu Thr Glu Arg Lys Lys Ala Glu Lys Gln				
545		550		555
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
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

ES 2 788 152 T3

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*

<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

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

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

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

ES 2 788 152 T3

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

5 <210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 37
ggatccatga agaaaggttc tcag 24

15 <210> 38
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 38
gtcgactcag ggtcgggtgcg cgtc 24

25 <210> 39
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 39
ggatccatga agaaaggttc tcaac 25

```

5  <210> 40
    <211> 25
    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> cebador

10  <400> 40
    gtcgactcat ctggctgagg cattc
                                     25

    <210> 41
    <211> 7770
    <212> ADN
    <213> Canis familiaris

    <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(7770)
    <223>

    <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 cgg 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

    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	tog	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	tog	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					
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
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 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	
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 Ala Arg Ile Ser Phe Asp Lys Arg Gln His Glu Ala Arg Ile Gln Gln 900 905 910			2736
ttg gag aat gaa att cac tat ttg caa gaa aat cta aaa agt atg gag Leu Glu Asn Glu Ile His Tyr Leu Gln Glu Asn Leu Lys Ser Met Glu 915 920 925			2784
gaa atc caa ggt ctc aca gac ctc caa ctt cag gaa gct gat gaa gag Glu Ile Gln Gly Leu Thr Asp Leu Gln Leu Gln Glu Ala Asp Glu Glu 930 935 940			2832
aag gag aga att ctg gcc caa ctc cgg gag tta gag aaa aag aag aaa Lys Glu Arg Ile Leu Ala Gln Leu Arg Glu Leu Glu Lys Lys Lys Lys 945 950 955 960			2880
ctt gag gat gcc aag tct cag gag cag ttt ctt gga tta gat aga gaa Leu Glu Asp Ala Lys Ser Gln Glu Gln Phe Leu Gly Leu Asp Arg Glu 965 970 975			2928
ttg aag aag cta aag aaa gct gtg gct gcc tct gat aag ctg gcc aca Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Val Ala Ala Ser Asp Lys Leu Ala Thr 980 985 990			2976
gct gag ctc acc att gcc aaa gac cag ctc aag tcc ctt cat gga act Ala Glu Leu Thr Ile Ala Lys Asp Gln Leu Lys Ser Leu His Gly Thr 995 1000 1005			3024
gtg atg aaa att aac cag gag cga gca gag gag ctg cag gag acg Val Met Lys Ile Asn Gln Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gln Glu Thr 1010 1015 1020			3069
gag agg ttc agc aga aag gca gca caa gca gct agg gat ctg atc Glu Arg Phe Ser Arg Lys Ala Ala Gln Ala Ala Arg Asp Leu Ile 1025 1030 1035			3114
cga gca gaa gcg gag att gaa ctc ctg cag aag ctt ctc aga gat Arg Ala Glu Ala Glu Ile Glu Leu Leu Gln Lys Leu Leu Arg Asp 1040 1045 1050			3159
aaa gag gag cag ttt cga aat gag att gag aaa gta gat gtc ggc Lys Glu Glu Gln Phe Arg Asn Glu Ile Glu Lys Val Asp Val Gly 1055 1060 1065			3204
tct gga gga gca aag tca cag atg ctg gag atg gag aaa cta aat Ser Gly Gly Ala Lys Ser Gln Met Leu Glu Met Glu Lys Leu Asn 1070 1075 1080			3249
gag aca atg gag agg caa aga aca gag att gct agg ctg agg aat Glu Thr Met Glu Arg Gln Arg Thr Glu Ile Ala Arg Leu Arg Asn 1085 1090 1095			3294
tta cta gac ctc acc ggg gct gat aac aaa gga aac ttt gaa aat Leu Leu Asp Leu Thr Gly Ala Asp Asn Lys Gly Asn Phe Glu Asn 1100 1105 1110			3339
gtt ttg gaa gaa att gct gaa ctt cga cgt gaa gtt tct cat cag Val Leu Glu Glu Ile Ala Glu Leu Arg Arg Glu Val Ser His Gln 1115 1120 1125			3384
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				
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 Gln Glu 1370	aag aaa gac tta gag Lys Lys Asp Leu Glu 1375	cat gaa gta gaa gaa tta cat aga His Glu Val Glu Glu Leu His Arg 1380	4149
acc atc Thr Ile 1385	caa aaa cat caa cag Gln Lys His Gln Gln 1390	cga aaa gat ttc att gat gga aac Arg Lys Asp Phe Ile Asp Gly Asn 1395	4194
gtt gag Val Glu 1400	agt ctt gtg aat gat Ser Leu Val Asn Asp 1405	cta gaa ata gag aag tca ctc aaa Leu Glu Ile Glu Lys Ser Leu Lys 1410	4239
cac cat His His 1415	gaa gat att gtt gat Glu Asp Ile Val Asp 1420	gaa att gaa tgt att gag agg acc Glu Ile Glu Cys Ile Glu Arg Thr 1425	4284
ctt ctg Leu Leu 1430	aag cgc cgt gca gag Lys Arg Arg Ala Glu 1435	ctc agg gaa gcc gac cgg ctg ctg Leu Arg Glu Ala Asp Arg Leu Leu 1440	4329
acg gag Thr Glu 1445	gct gaa agt gaa ctt Ala Glu Ser Glu Leu 1450	tca tgc acg aaa gag aaa aca aaa Ser Cys Thr Lys Glu Lys Thr Lys 1455	4374
cat gct His Ala 1460	gtt gag aag ttc act Val Glu Lys Phe Thr 1465	gat gcc aag aga aat tta ttg caa Asp Ala Lys Arg Asn Leu Leu Gln 1470	4419
act gag Thr Glu 1475	aaa gat gct gag gag Lys Asp Ala Glu Glu 1480	tta gaa agg aga gcc cag gaa act Leu Glu Arg Arg Ala Gln Glu Thr 1485	4464
gcc att Ala Ile 1490	aac ctc gtc aaa gcc Asn Leu Val Lys Ala 1495	gac cag cag ctg aga ttg ctc cag Asp Gln Gln Leu Arg Leu Leu Gln 1500	4509
gct gac Ala Asp 1505	acg aag gat ttg gag Thr Lys Asp Leu Glu 1510	cag cac aaa atg gag caa gag gaa Gln His Lys Met Glu Gln Glu Glu 1515	4554
atc ttg Ile Leu 1520	aaa gaa ata aac aaa Lys Glu Ile Asn Lys 1525	gtt gtt gca gca aaa gac tca gac Val Val Ala Ala Lys Asp Ser Asp 1530	4599
ttc cag Phe Gln 1535	agc cta aac aag aag Ser Leu Asn Lys Lys 1540	aag gaa gta ctg aca gga gag ctg Lys Glu Val Leu Thr Gly Glu Leu 1545	4644
cag aaa Gln Lys 1550	ctc cag aag gac att Leu Gln Lys Asp Ile 1555	gag act gca cgg cac aat gag gat Glu Thr Ala Arg His Asn Glu Asp 1560	4689
cag cac Gln His 1565	ctg cag gtc ctt aaa Leu Gln Val Leu Lys 1570	gag tcg gag acc ctc ctg cag gcc Glu Ser Glu Thr Leu Leu Gln Ala 1575	4734
aag aaa Lys Lys 1580	gct gag ctg gaa aat Ala Glu Leu Glu Asn 1585	ctg aaa agc cag gtg tca gga cag Leu Lys Ser Gln Val Ser Gly Gln 1590	4779
cag cag Gln Gln 1595	gag atg gcc gtc ttg Glu Met Ala Val Leu 1600	gac agg gag tta gga cac aag aag Asp Arg Glu Leu Gly His Lys Lys 1605	4824

gaa gag Glu Glu 1610	ctg cat ctc ctc Leu His Leu Leu	cag Gln 1615	gaa agc atg gtc Glu Ser Met Val	cag Gln 1620	gcc aaa gct Ala Lys Ala	4869
gac ctc Asp Leu 1625	cag gaa gca ctc Gln Glu Ala Leu	aga Arg 1630	cta gga gaa agt Leu Gly Glu Ser	gaa Glu 1635	gta act gag Val Thr Glu	4914
aag tgc Lys Cys 1640	aat cac att agg Asn His Ile Arg	gaa Glu 1645	gta aaa tct ctt Val Lys Ser Leu	ctg Leu 1650	gaa gaa ctc Glu Glu Leu	4959
agt ttt Ser Phe 1655	cag aaa gga gaa Gln Lys Gly Glu	ctg Leu 1660	aat gtc cag atc Asn Val Gln Ile	agt Ser 1665	gaa aaa aaa Glu Lys Lys	5004
act caa Thr Gln 1670	ctt gca ctc ata Leu Ala Leu Ile	aag Lys 1675	cag gaa att gaa Gln Glu Ile Glu	aaa Lys 1680	gag gaa gac Glu Glu Asp	5049
aat ctt Asn Leu 1685	cag gta gtt tta Gln Val Val Leu	ggg Gly 1690	caa atg tct aaa Gln Met Ser Lys	cat His 1695	aaa act gaa Lys Thr Glu	5094
cta aag Leu Lys 1700	aat att ctc gac Asn Ile Leu Asp	atg Met 1705	ttg caa ctt gaa Leu Gln Leu Glu	aat Asn 1710	aat gag ctc Asn Glu Leu	5139
caa ggt Gln Gly 1715	ttg aag ctc caa Leu Lys Leu Gln	cat His 1720	gac caa aag atg Asp Gln Lys Met	tct Ser 1725	gaa tta gag Glu Leu Glu	5184
aag act Lys Thr 1730	cgg gtt gaa gtg Arg Val Glu Val	ctg Leu 1735	gag gag aaa ctc Glu Glu Lys Leu	gag Glu 1740	tta gag agt Leu Glu Ser	5229
ctg cag Leu Gln 1745	cag gca gcc ctc Gln Ala Ala Leu	cga Arg 1750	cag aga ggg gag Gln Arg Gly Glu	ata Ile 1755	gag tgg cag Glu Trp Gln	5274
aag cag Lys Gln 1760	ctc ctc cag agg Leu Leu Gln Arg	aac Asn 1765	aca cag gaa gta Thr Gln Glu Val	gag Glu 1770	cgg atg act Arg Met Thr	5319
gct gag Ala Glu 1775	acc cga gca tta Thr Arg Ala Leu	cag Gln 1780	tca tgt gtt gag Ser Cys Val Glu	tct Ser 1785	ttg tgc aaa Leu Cys Lys	5364
gaa aag Glu Lys 1790	caa gat ctc gaa Gln Asp Leu Glu	gaa Glu 1795	aaa cag gac agc Lys Gln Asp Ser	tgg Trp 1800	gaa aag aag Glu Lys Lys	5409
ttg gca Leu Ala 1805	cag acc aaa cgg Gln Thr Lys Arg	gtt Val 1810	cta gca gct gca Leu Ala Ala Ala	gaa Glu 1815	gag gac agc Glu Asp Ser	5454
gag atg Glu Met 1820	gag cgg gca cgc Glu Arg Ala Arg	tta Leu 1825	gaa aag ttg gaa Glu Lys Leu Glu	ctg Leu 1830	gac gcc agg Asp Ala Arg	5499
aag ctc Lys Leu	cag cag gag ttg Gln Gln Glu Leu	gac Asp	caa cga aac agg Gln Arg Asn Arg	gag Glu	aag ctc tcc Lys Leu Ser	5544

ES 2 788 152 T3

1835	1840	1845	
ctg cat caa gac ctg gca gtg gtg cag cag cag cta caa gaa aaa Leu His Gln Asp Leu Ala Val Val Gln Gln Gln Leu Gln Glu Lys 1850 1855 1860			5589
cag gaa gca gta aac tca tta cag aag gaa cta gct gat gtc cag Gln Glu Ala Val Asn Ser Leu Gln Lys Glu Leu Ala Asp Val Gln 1865 1870 1875			5634
gag cat ttg gac cta gca gaa cag gag gtg ctc tgc acc acc aag Glu His Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Val Leu Cys Thr Thr Lys 1880 1885 1890			5679
cgc aag gac gca ctg ctc agc gaa cag acc agg ctc gag aag gac Arg Lys Asp Ala Leu Leu Ser Glu Gln Thr Arg Leu Glu Lys Asp 1895 1900 1905			5724
gtg ggt gaa tgg acg aag aag ttt gaa gac tgc cag aaa gaa ggg Val Gly Glu Trp Thr Lys Lys Phe Glu Asp Cys Gln Lys Glu Gly 1910 1915 1920			5769
gag aca aag cag caa cag ctt caa ggg ctt cag aag gag att gaa Glu Thr Lys Gln Gln Gln Leu Gln Gly Leu Gln Lys Glu Ile Glu 1925 1930 1935			5814
gga aac gag gcg aag cta gcc caa caa gaa atg atg ttt cag aga Gly Asn Glu Ala Lys Leu Ala Gln Gln Glu Met Met Phe Gln Arg 1940 1945 1950			5859
ctc cag aaa gag cga gaa tgt gaa gaa aaa aag tta gaa gct agt Leu Gln Lys Glu Arg Glu Cys Glu Glu Lys Lys Leu Glu Ala Ser 1955 1960 1965			5904
aaa gtg act ctg aag gag cag cag caa cag ctg gaa aag gaa ttg Lys Val Thr Leu Lys Glu Gln Gln Gln Gln Leu Glu Lys Glu Leu 1970 1975 1980			5949
atg gag cag aaa ggc aag ctg gac cag gtg ctc gct aag ctc ttg Met Glu Gln Lys Gly Lys Leu Asp Gln Val Leu Ala Lys Leu Leu 1985 1990 1995			5994
gtg gct gag gag cgt gtc agg acc ttg cag gag gag gga agg tgg Val Ala Glu Glu Arg Val Arg Thr Leu Gln Glu Glu Gly Arg Trp 2000 2005 2010			6039
agc gag acc ctg gag aag acg ctc tcc cag acc aag cga cag ctt Ser Glu Thr Leu Glu Lys Thr Leu Ser Gln Thr Lys Arg Gln Leu 2015 2020 2025			6084
tca gaa cgg gag cag cag tta ctg gcc aag tca gac gag ctg ctg Ser Glu Arg Glu Gln Gln Leu Leu Ala Lys Ser Asp Glu Leu Leu 2030 2035 2040			6129
gcc ctg cag aag gag acg gac tcc atg agg gcg gac ttc agc ctc Ala Leu Gln Lys Glu Thr Asp Ser Met Arg Ala Asp Phe Ser Leu 2045 2050 2055			6174
ttg cgc aac cag ttc ctg aca gaa aga aag aaa gcc gag aag cag Leu Arg Asn Gln Phe Leu Thr Glu Arg Lys Lys Ala Glu Lys Gln 2060 2065 2070			6219
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				
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	ggc	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 ccg ccg ggg ccc agc cag gag ctg cac gtg ctg ggg tcg Asp Glu Pro Pro Gly Pro Ser Gln Glu Leu His Val Leu Gly Ser 2315 2320 2325	6984
ggc ggc agc gac cga ggt gga gga cgg ggc ggg ggc agg aag ggc Gly Gly Ser Asp Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Arg Lys Gly 2330 2335 2340	7029
ctt tcc cga cgc cgc cgc tgg aac cac gga gaa gcg cgc ctc ggc Leu Ser Arg Arg Arg Arg Trp Asn His Gly Glu Ala Arg Leu Gly 2345 2350 2355	7074
ccg cgg agg ccc cca cgg gag ggg gca ggg cgg ggc gcg gcc ttc Pro Arg Arg Pro Pro Arg Glu Gly Ala Gly Arg Gly Ala Ala Phe 2360 2365 2370	7119
cga gcc ttg gtc tcc tgc tcc cgc cct gca gag ctc ccg gcg gct Arg Ala Leu Val Ser Cys Ser Arg Pro Ala Glu Leu Pro Ala Ala 2375 2380 2385	7164
ccc ccg agg ccc gtc gcc gcg gct gga cgc gca ccg acc ctg agg Pro Pro Arg Pro Val Ala Ala Ala Gly Arg Ala Pro Thr Leu Arg 2390 2395 2400	7209
acc cgg agg acc cgg agg ccc ggc gtc ccc tcg gaa cgc ttc ctc Thr Arg Arg Thr Arg Arg Pro Gly Val Pro Ser Glu Arg Phe Leu 2405 2410 2415	7254
cgc gtc cgc gga cac cag gct cac ggg aag gcg cgt cca tgc ggg Arg Val Arg Gly His Gln Ala His Gly Lys Ala Arg Pro Cys Gly 2420 2425 2430	7299
aag agc cgc gag cgg aac ccg gat gcc cgg gct ggt ctc tgg gcc Lys Ser Arg Glu Arg Asn Pro Asp Ala Arg Ala Gly Leu Trp Ala 2435 2440 2445	7344
ttg gaa acg tgt tgc cgt aaa agc agc gcc cgc ggc tgc gga ctt Leu Glu Thr Cys Cys Arg Lys Ser Ser Ala Arg Gly Cys Gly Leu 2450 2455 2460	7389
gaa gcc ccg aac tgc cgc cgt gcc cgg tgc gga gcg agc gtg cgg Glu Ala Pro Asn Cys Arg Arg Ala Arg Cys Gly Ala Ser Val Arg 2465 2470 2475	7434
tac cct ctc gtg cct cgg ggc cgg act gga cga ggg gcc gtg acc Tyr Pro Leu Val Pro Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Ala Val Thr 2480 2485 2490	7479
ccg tgg ggc cgc ctg cag tcc cga ggg acg cgg acc acc ccc cgg Pro Trp Gly Arg Leu Gln Ser Arg Gly Thr Arg Thr Thr Pro Arg 2495 2500 2505	7524
ccg gtg cga cgg gag cat ccc cag cac cag gaa agg ccc cca ggg Pro Val Arg Arg Glu His Pro Gln His Gln Glu Arg Pro Pro Gly 2510 2515 2520	7569
cgc gtt acc gcg gcc cac act gag acc gcc cct ccc cgc cgg gtg Arg Val Thr Ala Ala His Thr Glu Thr Ala Pro Pro Arg Arg Val 2525 2530 2535	7614
ttc cac gcg cga gta gca gtc ggg gag gtc agc ctc ggg ccc ggc Phe His Ala Arg Val Ala Val Gly Glu Val Ser Leu Gly Pro Gly 2540 2545 2550	7659

ES 2 788 152 T3

```

cgc ggt   ctc gag cga aca cgg   gcc ggg gcc ggg ggg   gcc ggg gcc   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 gcc   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*
 <400> 42

5

```

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

```

10

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	
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	
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
 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
 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

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			
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				
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
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 1880	His	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu 1885	Gln	Glu	Val	Leu	Cys 1890	Thr	Thr	Lys
Arg 1895	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Ser 1900	Glu	Gln	Thr	Arg	Leu 1905	Glu	Lys	Asp
Val 1910	Gly	Glu	Trp	Thr	Lys	Lys 1915	Phe	Glu	Asp	Cys	Gln 1920	Lys	Glu	Gly
Glu 1925	Thr	Lys	Gln	Gln	Gln	Leu 1930	Gln	Gly	Leu	Gln	Lys 1935	Glu	Ile	Glu
Gly 1940	Asn	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala 1945	Gln	Gln	Glu	Met	Met 1950	Phe	Gln	Arg
Leu 1955	Gln	Lys	Glu	Arg	Glu	Cys 1960	Glu	Glu	Lys	Lys	Leu 1965	Glu	Ala	Ser
Lys 1970	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Gln 1975	Gln	Gln	Gln	Leu	Glu 1980	Lys	Glu	Leu
Met 1985	Glu	Gln	Lys	Gly	Lys	Leu 1990	Asp	Gln	Val	Leu	Ala 1995	Lys	Leu	Leu
Val 2000	Ala	Glu	Glu	Arg	Val	Arg 2005	Thr	Leu	Gln	Glu	Glu 2010	Gly	Arg	Trp
Ser 2015	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Thr 2020	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys 2025	Arg	Gln	Leu
Ser 2030	Glu	Arg	Glu	Gln	Gln	Leu 2035	Leu	Ala	Lys	Ser	Asp 2040	Glu	Leu	Leu
Ala 2045	Leu	Gln	Lys	Glu	Thr	Asp 2050	Ser	Met	Arg	Ala	Asp 2055	Phe	Ser	Leu
Leu 2060	Arg	Asn	Gln	Phe	Leu	Thr 2065	Glu	Arg	Lys	Lys	Ala 2070	Glu	Lys	Gln
Val 2075	Ala	Ser	Leu	Lys	Glu	Ala 2080	Leu	Lys	Ile	Gln	Arg 2085	Ser	Gln	Leu
Glu 2090	Lys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gln 2095	Lys	Gln	Glu	Asn	Ser 2100	Cys	Met	Gln
Arg 2105	Glu	Met	Ala	Thr	Ile	Glu 2110	Gln	Val	Ala	Gln	Asp 2115	Asn	His	Glu

Arg 2120	Ala	Arg Arg Leu Met	Arg 2125	Glu Leu Asn Gln Met	Gln Arg Glu 2130
Tyr Val 2135	Glu Leu Arg Lys	Gln 2140	Met Thr Asn Gln Lys	Asp Leu Glu 2145	
Arg Arg 2150	Gln Met Glu Ile Ser	Asp Ala Met Gln Ala	Leu Lys Cys 2160		
Glu Val 2165	Lys Asp Glu Ile Arg	Thr Ser Leu Lys Asn	Leu Asn Gln 2175		
Phe Leu 2180	Pro Glu Leu Pro Ala	Asp Leu Glu Ala Leu	Leu Glu Arg 2190		
Asn Glu 2195	Asn Leu Gly Gly Gly	Leu Glu Ser Leu Lys	Glu Asn Phe 2205		
Pro Phe 2210	Thr Val Ser Asp Arg	Pro Ser Ser Cys Glu	Glu Lys Leu 2220		
Asn Phe 2225	Gly Gln Ala His Val	Ala Asp Glu Gln Trp	Arg Gly Glu 2235		
Ala Leu 2240	Arg Glu Lys Leu Arg	His Arg Glu Asp Arg	Leu Lys Ala 2250		
Gln Leu 2255	Arg Arg Cys Met Ser	Lys Gln Ala Glu Val	Leu Ser Glu 2265		
Gly Arg 2270	Arg Arg Thr Glu Gly	Thr Leu His Ser Leu	Arg Arg Gln 2280		
Val Asp 2285	Ala Leu Gly Glu Leu	Val Thr Ser Thr Ser	Gly Asp Ser 2295		
Ala Ser 2300	Thr Arg Ser Leu Ser	Arg Thr Glu Gly Ser	Leu Ala Glu 2310		
Asp Glu 2315	Pro Pro Gly Pro Ser	Gln Glu Leu His Val	Leu Gly Ser 2325		
Gly Gly 2330	Ser Asp Arg Gly Gly	Gly Arg Gly Gly Gly	Arg Lys Gly 2340		
Leu Ser	Arg Arg Arg Arg Trp	Asn His Gly Glu Ala	Arg Leu Gly		

2345		2350		2355
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
2585

5	<210> 43 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> cebador		
	<400> 43 gtcgacctat gcggaggggt ctg	23	
15	<210> 44 <211> 6046 <212> ADN <213> <i>Canis familiaris</i>		
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 Met Ser Ser Trp Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Leu Gly Gln Ser Leu 1 5 10 15	48	
	ggg caa gtc gga ggc agc ctg gcc tcc ctc act ggc cag att tca aac Gly Gln Val Gly Gly Ser Leu Ala Ser Leu Thr Gly Gln Ile Ser Asn 20 25 30	96	
	ttt acg aag gac atg ctg atg gag ggc acg gag gag gtg gaa gca gaa Phe Thr Lys Asp Met Leu Met Glu Gly Thr Glu Glu Val Glu Ala Glu 35 40 45	144	
	tta cct aat tct agg aga aag gaa gtt gaa gcc att cat gca atc tta Leu Pro Asn Ser Arg Arg Lys Glu Val Glu Ala Ile His Ala Ile Leu 50 55 60	192	
	aga tca gag aat gag aga ctc aaa gaa ctt tgt act gat tta gaa gag Arg Ser Glu Asn Glu Arg Leu Lys Glu Leu Cys Thr Asp Leu Glu Glu 65 70 75 80	240	
	aag cat gaa gca tca gag ctt caa ata aag caa caa tct aca aat tac Lys His Glu Ala Ser Glu Leu Gln Ile Lys Gln Gln Ser Thr Asn Tyr 85 90 95	288	
	cga aat caa cta caa cag aaa gag gta gaa atc agc cat ctt aaa gca Arg Asn Gln Leu Gln Gln Lys Glu Val Glu Ile Ser His Leu Lys Ala 100 105 110	336	
	aga cag att gca ctg cag gat cag ttg ctg aag ctg cag tca gct gct Arg Gln Ile Ala Leu Gln Asp Gln Leu Leu Lys Leu Gln Ser Ala Ala 115 120 125	384	
	cag tct gca cat tca gga gct agc agc gta cca gca gcc ctg gca tca Gln Ser Ala His Ser Gly Ala Ser Ser Val Pro Ala Ala Leu Ala Ser 130 135 140	432	

tct ccg ttc agc tat tct gtc agt cat cat gct tca gct ttc cat gac Ser Pro Phe Ser Tyr Ser Val Ser His His Ala Ser Ala Phe His Asp 145 150 155 160	480
gat gac atg gac ttc agt gac ata att tca tca caa caa gaa ata aac Asp Asp Met Asp Phe Ser Asp Ile Ile Ser Ser Gln Gln Glu Ile Asn 165 170 175	528
aga tta tca aat gaa gtt tca aga ctt gag tct gag gtt ggc cat tgg Arg Leu Ser Asn Glu Val Ser Arg Leu Glu Ser Glu Val Gly His Trp 180 185 190	576
agg cat att gct cag act tct aaa gca caa gga tca aat agc tct gat Arg His Ile Ala Gln Thr Ser Lys Ala Gln Gly Ser Asn Ser Ser Asp 195 200 205	624
caa agt gaa atc tgt aaa cta caa agt atc att aag gaa ctc aaa cag Gln Ser Glu Ile Cys Lys Leu Gln Ser Ile Ile Lys Glu Leu Lys Gln 210 215 220	672
att cga agt cag gaa atc gat gac cat caa cat gaa atg tca gtg ttg Ile Arg Ser Gln Glu Ile Asp Asp His Gln His Glu Met Ser Val Leu 225 230 235 240	720
cag aat gca cat caa cag aag ttg aca gat ata agt cgt cgg cat cga Gln Asn Ala His Gln Gln Lys Leu Thr Asp Ile Ser Arg Arg His Arg 245 250 255	768
gaa gaa tta cgt gac tat gaa gaa cga att gaa gaa ctg gaa aat ctg Glu Glu Leu Arg Asp Tyr Glu Glu Arg Ile Glu Glu Leu Glu Asn Leu 260 265 270	816
tta gaa caa ggt ggc tca gga att gta ata cct gat cac tca aaa atc Leu Glu Gln Gly Gly Ser Gly Ile Val Ile Pro Asp His Ser Lys Ile 275 280 285	864
cat gag atg caa aaa act att cag aat cta caa act gaa aaa gta gca His Glu Met Gln Lys Thr Ile Gln Asn Leu Gln Thr Glu Lys Val Ala 290 295 300	912
tct ata aaa aaa att gaa gaa ctt gag gat aaa ata aaa gac ata gat Ser Ile Lys Lys Ile Glu Glu Leu Glu Asp Lys Ile Lys Asp Ile Asp 305 310 315 320	960
aaa aaa ttg tct tct gca gaa aat gac aga gat gtt ttg agg aag gag Lys Lys Leu Ser Ser Ala Glu Asn Asp Arg Asp Val Leu Arg Lys Glu 325 330 335	1008
aaa gaa tgc cta aat gtt gaa aac aga caa ata aca gaa caa tgt gaa Lys Glu Cys Leu Asn Val Glu Asn Arg Gln Ile Thr Glu Gln Cys Glu 340 345 350	1056
agc ttg aaa ctg gaa tgt aaa ttg cag cat gat gct gag aag caa ggt Ser Leu Lys Leu Glu Cys Lys Leu Gln His Asp Ala Glu Lys Gln Gly 355 360 365	1104
gat act gtg aca gaa aaa gaa aga atc ctt cca cag agt aca tca gtg Asp Thr Val Thr Glu Lys Glu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Thr Ser Val 370 375 380	1152
gaa gag gaa gtg ctc aaa ctg cag caa gca ctg tct gat gcg gaa aat Glu Glu Glu Val Leu Lys Leu Gln Gln Ala Leu Ser Asp Ala Glu Asn 385 390 395 400	1200

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
Arg Asp Glu Leu Thr Gln Ser Leu Ser Arg Asp Ser Gly Ser Asp Phe	
625 630 635 640	
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			
					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			
					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			
					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	
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 Leu Ser Ala Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gln Asp Met Phe Arg Glu 1145 1150 1155	3474
act gtc cag aat tta tca cgt atc att cga gaa aaa gac att gag Thr Val Gln Asn Leu Ser Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Ile Glu 1160 1165 1170	3519
ata gat gcg tta agt cag aag tgc cag acc tta ttg aca gtt tta Ile Asp Ala Leu Ser Gln Lys Cys Gln Thr Leu Leu Thr Val Leu 1175 1180 1185	3564
caa aca tcg agc act ggg aat gag gtt gga ggc gtt aat agc aat Gln Thr Ser Ser Thr Gly Asn Glu Val Gly Gly Val Asn Ser Asn 1190 1195 1200	3609
cag ttt gag gag ctt cta cag gaa cgc gac aaa tta aaa caa caa Gln Phe Glu Glu Leu Leu Gln Glu Arg Asp Lys Leu Lys Gln Gln 1205 1210 1215	3654
gta aag aag atg gaa gag tgg aaa cag cag gtg atg acc aca gtt Val Lys Lys Met Glu Glu Trp Lys Gln Gln Val Met Thr Thr Val 1220 1225 1230	3699
cag aat atg cag cat gag tca gcc cag ctt caa gaa gaa ctt cat Gln Asn Met Gln His Glu Ser Ala Gln Leu Gln Glu Glu Leu His 1235 1240 1245	3744
cag ctt cag gca caa gtt ttg gtt gac agt gat aat aat tct aaa Gln Leu Gln Ala Gln Val Leu Val Asp Ser Asp Asn Asn Ser Lys 1250 1255 1260	3789
tta caa gtg gat tat act ggc ctg atc caa agt tat gag cag aat Leu Gln Val Asp Tyr Thr Gly Leu Ile Gln Ser Tyr Glu Gln Asn 1265 1270 1275	3834
gaa act aaa ctc aaa aat ttt ggg cag gag cta gca caa gtt cag Glu Thr Lys Leu Lys Asn Phe Gly Gln Glu Leu Ala Glu Val Gln 1280 1285 1290	3879
cac agc ata ggg cag ctg tac agt acc aaa gac ctt ctc tta gga His Ser Ile Gly Gln Leu Tyr Ser Thr Lys Asp Leu Leu Leu Gly 1295 1300 1305	3924
aaa ctt gat att att tct cct caa ctc ccc tcc gga tca tcg cct Lys Leu Asp Ile Ile Ser Pro Gln Leu Pro Ser Gly Ser Ser Pro 1310 1315 1320	3969
cct tcc cag tca gca gag tct ctt gga atg gat aag cgt gat aca Pro Ser Gln Ser Ala Glu Ser Leu Gly Met Asp Lys Arg Asp Thr 1325 1330 1335	4014
tca agt gag tct tca aaa cag gag cta gaa gag cta aga aag tca Ser Ser Glu Ser Ser Lys Gln Glu Leu Glu Glu Leu Arg Lys Ser 1340 1345 1350	4059
ctg cag gaa aaa gat gca acg att aaa aca ctc cag gaa aat aac Leu Gln Glu Lys Asp Ala Thr Ile Lys Thr Leu Gln Glu Asn Asn 1355 1360 1365	4104
cac aga ttg tcc gat tca att gct gcc acc tca gag cta gaa aga His Arg Leu Ser Asp Ser Ile Ala Ala Thr Ser Glu Leu Glu Arg 1370 1375 1380	4149

aaa gaa cac gaa cag act gat tca gaa att aag cag cta aag gag Lys Glu His Glu Gln Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Leu Lys Glu 1385 1390 1395	4194
aaa caa gat gtt tta caa aag tca ctt aag gag aaa gac ctc tta Lys Gln Asp Val Leu Gln Lys Ser Leu Lys Glu Lys Asp Leu Leu 1400 1405 1410	4239
atc aaa gcc aaa agt gat cag tta ctt tct tta aat gaa aat ttc Ile Lys Ala Lys Ser Asp Gln Leu Leu Ser Leu Asn Glu Asn Phe 1415 1420 1425	4284
acc aac aaa gtg aat gaa aat gaa ctc ttg agg cag gca gta acc Thr Asn Lys Val Asn Glu Asn Glu Leu Leu Arg Gln Ala Val Thr 1430 1435 1440	4329
aac ctg aag gag cgg gta tta att tta gaa atg gac att ggt aaa Asn Leu Lys Glu Arg Val Leu Ile Leu Glu Met Asp Ile Gly Lys 1445 1450 1455	4374
cta aaa gaa gaa aat gaa aaa ata gtt gaa aga acc agg gaa aag Leu Lys Glu Glu Asn Glu Lys Ile Val Glu Arg Thr Arg Glu Lys 1460 1465 1470	4419
gaa acg gag tat caa gca tta cag gag act aat atg aag ttt tcc Glu Thr Glu Tyr Gln Ala Leu Gln Glu Thr Asn Met Lys Phe Ser 1475 1480 1485	4464
atg atg ctt cga gaa aaa gag ttt gag tgc cat tca atg aag gaa Met Met Leu Arg Glu Lys Glu Phe Glu Cys His Ser Met Lys Glu 1490 1495 1500	4509
aaa tct ctt gca ttt gag cag cta ctg aaa gaa aaa gag cag ggc Lys Ser Leu Ala Phe Glu Gln Leu Leu Lys Glu Lys Glu Gln Gly 1505 1510 1515	4554
aag act ggg gag tta aat caa ctt tta aat gca gtt aag tca atg Lys Thr Gly Glu Leu Asn Gln Leu Leu Asn Ala Val Lys Ser Met 1520 1525 1530	4599
cag gag aag aca gtt aag ttt caa caa gag aga gac cag gtc atg Gln Glu Lys Thr Val Lys Phe Gln Gln Glu Arg Asp Gln Val Met 1535 1540 1545	4644
ttg gcc ctg aaa cag aaa caa atg gaa aac agt gct tta cag aat Leu Ala Leu Lys Gln Lys Gln Met Glu Asn Ser Ala Leu Gln Asn 1550 1555 1560	4689
gag gtt caa cat tta cgc gac aaa gaa tta cgc tta aac cag gag Glu Val Gln His Leu Arg Asp Lys Glu Leu Arg Leu Asn Gln Glu 1565 1570 1575	4734
cta gag aga ttg cgt aac cat ctt tta gaa tca gag gat tct tac Leu Glu Arg Leu Arg Asn His Leu Leu Glu Ser Glu Asp Ser Tyr 1580 1585 1590	4779
acc cgt gaa gct ttg gct gca gaa gag aga gag gcc aaa ctg aga Thr Arg Glu Ala Leu Ala Ala Glu Glu Arg Glu Glu Lys Leu Arg 1595 1600 1605	4824
agg aaa gtc aca gta ttg gag gaa aag cta gtt tca tct tct aat Arg Lys Val Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Val Ser Ser Ser Asn 1610 1615 1620	4869

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			
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 atgattctca	agccagagac	5954
Val Val Leu Lys Asp Leu Leu	Lys Gln		
1970	1975		
aacatatgta gcactttaaa gaaaccatga acactatgtg tatgtacttt atcacaaagt			6014
ggccttttcag aaaaagtcac gtgtttgttt gc			6046

<210> 45
 <211> 1977
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<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
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
 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

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	
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			
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
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 1550	Leu Lys Gln Lys Gln 1555	Met Glu Asn Ser Ala 1560	Leu Gln Asn
Glu Val 1565	Gln His Leu Arg Asp 1570	Lys Glu Leu Arg Leu 1575	Asn Gln Glu
Leu Glu 1580	Arg Leu Arg Asn His 1585	Leu Leu Glu Ser Glu 1590	Asp Ser Tyr
Thr Arg 1595	Glu Ala Leu Ala Ala 1600	Glu Glu Arg Glu Ala 1605	Lys Leu Arg
Arg Lys 1610	Val Thr Val Leu Glu 1615	Glu Lys Leu Val Ser 1620	Ser Ser Asn
Ala Met 1625	Glu Asn Ala Ser His 1630	Gln Ala Ser Leu Gln 1635	Val Glu Ser
Leu Gln 1640	Glu Gln Leu Asn Val 1645	Val Ser Lys Gln Arg 1650	Asp Glu Thr
Ala Leu 1655	Gln Leu Ser Val Ser 1660	Arg Glu Gln Val Lys 1665	Gln Tyr Ala
Leu Ser 1670	Leu Ser Asn Leu Gln 1675	Met Val Leu Glu His 1680	Phe Gln Gln
Glu Glu 1685	Lys Ala Val Tyr Ser 1690	Ala Glu Leu Glu Lys 1695	His Lys Gln
Leu Val 1700	Ala Glu Trp Lys Lys 1705	Lys Ala Glu Asn Leu 1710	Glu Gly Lys
Leu Met 1715	Ser Leu Gln Glu Arg 1720	Phe Asp Glu Ala Asn 1725	Ala Ala Leu
Asp Ser 1730	Ala Ser Arg Leu Thr 1735	Glu Gln Leu Asp Leu 1740	Lys Glu Glu
Gln Ile 1745	Glu Glu Leu Lys Lys 1750	Gln Asn Glu Leu Arg 1755	Gln Glu Met
Leu Asp 1760	Asp Val Gln Lys Lys 1765	Leu Met Asn Leu Val 1770	Asn Ser Thr
Glu Gly	Lys Val Asp Lys Val	Leu Met Arg Asn Leu	Phe Ile Gly

1775		1780		1785
His Phe 1790	His Thr Pro Lys	His Gln Arg His Glu Val 1795		Leu Arg Leu 1800
Met Gly 1805	Ser Ile Leu Gly	Ile Lys Arg Glu Glu Met 1810		Glu Gln Leu 1815
Leu His 1820	Glu Asp Gln Gly	Gly Val Thr Arg Trp Met 1825		Thr Gly Trp 1830
Leu Gly 1835	Gly Gly Ser Lys	Ser Val Pro Asn Thr Pro 1840		Leu Arg Pro 1845
Asn Gln 1850	Gln Ser Val Leu	Asn Ser Ser Phe Ser Glu 1855		Leu Phe Val 1860
Lys Phe 1865	Leu Glu Thr Glu	Ser His Pro Ser Val Pro 1870		Pro Pro Lys 1875
Leu Ser 1880	Val His Asp Met	Lys Pro Leu Asp Ser Pro 1885		Gly Arg Arg 1890
Lys Val 1895	Val Ile His Val	Ser Glu Ser Phe Lys Glu 1900		Thr Thr Glu 1905
Ser Arg 1910	Cys Gly Arg Arg	Thr Asp Val Asn Pro Phe 1915		Leu Ala Pro 1920
Arg Ser 1925	Ala Ala Val Pro	Leu Ile Asn Pro Ala Gly 1930		Leu Gly Pro 1935
Gly Gly 1940	Pro Gly His Leu	Leu Leu Lys Pro Ile Ser 1945		Asp Val Leu 1950
Pro Thr 1955	Phe Thr Pro Leu	Pro Val Ser Pro Asp Asn 1960		Ser Ala Gly 1965
Val Val 1970	Leu Lys Asp Leu	Leu Lys Gln 1975		

<210> 46
 <211> 6452
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (357)..(6296)
 <223>

<400> 46

cgagcgcgagtg tcatggcggc cggcgtcgag ttggcaggag taaccacg aactgaggaa	60
agtcattaga gctgagaaag aagtggccca atctggacgg tgggaattcg tgggaatgag	120
cagaaggccc tccgtagtga ctgtgtcact agaggcgggc ccctggtaaa attccaggcc	180
aggcctctgc gtttctaggg agaacctgga gtcggccttg cctgagaacc cagctttgtg	240
ttatcgtatc ctgtctcgcg aaggcaggcg ttcaaggata tttggtcgga tgcgccggcg	300
gcgctaaacg ttttcttttt tccgagcgga cggggtcggt ctctaaactc gcgcgc atg	359
	Met
	1
tgc 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
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 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 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 tot 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	

ES 2 788 152 T3

180	185	190	
att gct cag act tcc aaa gca caa gga aca gat aac tct gat caa agt Ile Ala Gln Thr Ser Lys Ala Gln Gly Thr Asp Asn Ser Asp Gln Ser 195 200 205			983
gaa ata tgt aaa cta caa aat atc att aag gaa cta aaa cag aac cga Glu Ile Cys Lys Leu Gln Asn Ile Ile Lys Glu Leu Lys Gln Asn Arg 210 215 220 225			1031
agt cag gaa att gat gac cat caa cat gaa atg tca gta ctg cag aat Ser Gln Glu Ile Asp Asp His Gln His Glu Met Ser Val Leu Gln Asn 230 235 240			1079
gca cac caa cag aaa ttg aca gaa ata agt cga cga cat cga gaa gaa Ala His Gln Gln Lys Leu Thr Glu Ile Ser Arg Arg His Arg Glu Glu 245 250 255			1127
tta agt gac tat gaa gaa cga att gaa gaa ctt gaa aat ctg tta caa Leu Ser Asp Tyr Glu Glu Arg Ile Glu Glu Leu Glu Asn Leu Leu Gln 260 265 270			1175
caa ggt ggc tct gga gtt ata gaa act gat ctc tct aaa atc tat gag Gln Gly Gly Ser Gly Val Ile Glu Thr Asp Leu Ser Lys Ile Tyr Glu 275 280 285			1223
atg caa aaa act att caa gtt cta caa ata gaa aaa gtg gag tct acc Met Gln Lys Thr Ile Gln Val Leu Gln Ile Glu Lys Val Glu Ser Thr 290 295 300 305			1271
aaa aaa atg gaa caa ctt gag gat aaa ata aaa gat ata aat aaa aaa Lys Lys Met Glu Gln Leu Glu Asp Lys Ile Lys Asp Ile Asn Lys Lys 310 315 320			1319
tta tct tct gca gaa aat gac aga gat att ttg agg agg gaa caa gaa Leu Ser Ser Ala Glu Asn Asp Arg Asp Ile Leu Arg Arg Glu Gln Glu 325 330 335			1367
cag cta aat gtg gaa aag aga caa ata atg gaa gaa tgt gaa aac ttg Gln Leu Asn Val Glu Lys Arg Gln Ile Met Glu Glu Cys Glu Asn Leu 340 345 350			1415
aaa ttg gaa tgt agt aaa ttg cag cct tct gct gtg aag caa agt gat Lys Leu Glu Cys Ser Lys Leu Gln Pro Ser Ala Val Lys Gln Ser Asp 355 360 365			1463
act atg aca gaa aag gaa aga att ctt gcc cag agt gca tca gtg gaa Thr Met Thr Glu Lys Glu Arg Ile Leu Ala Gln Ser Ala Ser Val Glu 370 375 380 385			1511
gaa gtg ttc aga cta caa caa gca ctg tct gat gcc gaa aat gaa ata Glu Val Phe Arg Leu Gln Gln Ala Leu Ser Asp Ala Glu Asn Glu Ile 390 395 400			1559
atg aga ttg agt agt tta aac cag gat aac agt ctt gct gaa gac aat Met Arg Leu Ser Ser Leu Asn Gln Asp Asn Ser Leu Ala Glu Asp Asn 405 410 415			1607
ctg aaa ctt aaa atg cgt atc gaa gtt tta gaa aaa gag aag tca tta Leu Lys Leu Lys Met Arg Ile Glu Val Leu Glu Lys Glu Lys Ser Leu 420 425 430			1655
ctg agt caa gaa aag gaa gaa ctt cag atg tca ctt tta aaa ttg aac			1703

Leu 435	Ser	Gln	Glu	Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Met	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	
						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
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 Arg His Gln Leu Glu Glu Cys Leu Ala Gly Asn Asn Gln Leu Ser Leu 690 695 700 705	2471
gaa aaa aac act att gtg gag act cta aaa atg gaa aaa gga gag ata Glu Lys Asn Thr Ile Val Glu Thr Leu Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile 710 715 720	2519
gag gca gaa ttg tgt tgg gct aaa aag agg ctg ttg gaa gaa gca aac Glu Ala Glu Leu Cys Trp Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Glu Ala Asn 725 730 735	2567
aag tat gag aaa acc att gaa gaa ctg tca aat gca cgt aat ttg aat Lys Tyr Glu Lys Thr Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ala Arg Asn Leu Asn 740 745 750	2615
acc tot gcc tta cag ctg gaa cat gag cat tta att aaa ctc aat caa Thr Ser Ala Leu Gln Leu Glu His Glu His Leu Ile Lys Leu Asn Gln 755 760 765	2663
aag aaa gac atg gaa ata gca gaa ctc aaa aag aat att gaa caa atg Lys Lys Asp Met Glu Ile Ala Glu Leu Lys Lys Asn Ile Glu Gln Met 770 775 780 785	2711
gat act gac cat aaa gaa act aag gac gtt ttg tca tct agt tta gaa Asp Thr Asp His Lys Glu Thr Lys Asp Val Leu Ser Ser Ser Leu Glu 790 795 800	2759
gag cag aag cag ttg aca caa ctt ata aac aag aaa gaa att ttt att Glu Gln Lys Gln Leu Thr Gln Leu Ile Asn Lys Lys Glu Ile Phe Ile 805 810 815	2807
gaa aag ctt aaa gaa aga agt tca aag ctg cag gag gaa ttg gat aaa Glu Lys Leu Lys Glu Arg Ser Ser Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asp Lys 820 825 830	2855
tat tot cag gcc tta aga aaa aat gaa att tta aga cag acc ata gag Tyr Ser Gln Ala Leu Arg Lys Asn Glu Ile Leu Arg Gln Thr Ile Glu 835 840 845	2903
gaa aaa gac cga agt ctt gga tcc atg aaa gag gaa aat aat cat ctg Glu Lys Asp Arg Ser Leu Gly Ser Met Lys Glu Glu Asn Asn His Leu 850 855 860 865	2951
caa gaa gaa ttg gaa cga ctc agg gaa gag cag agt cga acc gca cct Gln Glu Glu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Glu Gln Ser Arg Thr Ala Pro 870 875 880	2999
gtg gct gac cct aaa acc ctt gat agt gtt act gaa cta gca tct gag Val Ala Asp Pro Lys Thr Leu Asp Ser Val Thr Glu Leu Ala Ser Glu 885 890 895	3047
gta tot caa ctg aac acg atc aag gaa cat ctt gaa gag gaa att aaa Val Ser Gln Leu Asn Thr Ile Lys Glu His Leu Glu Glu Glu Ile Lys 900 905 910	3095
cat cat caa aag ata att gaa gat caa aac cag agt aag atg caa cta His His Gln Lys Ile Ile Glu Asp Gln Asn Gln Ser Lys Met Gln Leu 915 920 925	3143
ctt cag tct tta caa gag caa aag aag gaa atg gat gag ttt aga tac Leu Gln Ser Leu Gln Glu Gln Lys Lys Glu Met Asp Glu Phe Arg Tyr 930 935 940 945	3191

cag cat gag caa atg aac gcc aca cac acc cag ctc ttt tta gag aag Gln His Glu Gln Met Asn Ala Thr His Thr Gln Leu Phe Leu Glu Lys 950 955 960	3239
gat gag gaa att aag agt ttg caa aaa aca att gaa caa atc aaa acc Asp Glu Glu Ile Lys Ser Leu Gln Lys Thr Ile Glu Gln Ile Lys Thr 965 970 975	3287
cag ttg cat gaa gaa aga cag gac att caa aca gat aac tct gat att Gln Leu His Glu Glu Arg Gln Asp Ile Gln Thr Asp Asn Ser Asp Ile 980 985 990	3335
ttt caa gaa aca aaa gtt cag agc ctt aat ata gaa aat gga agt gaa Phe Gln Glu Thr Lys Val Gln Ser Leu Asn Ile Glu Asn Gly Ser Glu 995 1000 1005	3383
aag cat gat tta tct aaa gct gaa acg gaa aga tta gtg aaa gga Lys His Asp Leu Ser Lys Ala Glu Thr Glu Arg Leu Val Lys Gly 1010 1015 1020	3428
ata aaa gag cga gaa ctg gag att aaa ctt cta aat gaa aag aat Ile Lys Glu Arg Glu Leu Glu Ile Lys Leu Leu Asn Glu Lys Asn 1025 1030 1035	3473
ata tct tta act aaa cag att gat cag ttg tcc aaa gat gaa gtt Ile Ser Leu Thr Lys Gln Ile Asp Gln Leu Ser Lys Asp Glu Val 1040 1045 1050	3518
ggt aaa cta act cag att att cag cag aaa gat ttg gag ata caa Gly Lys Leu Thr Gln Ile Ile Gln Gln Lys Asp Leu Glu Ile Gln 1055 1060 1065	3563
gct ctt cat gct aga att tct tca act tcc cat act caa gat gtt Ala Leu His Ala Arg Ile Ser Ser Thr Ser His Thr Gln Asp Val 1070 1075 1080	3608
gtt tac ctt caa cag caa ctg cag gct tat gct atg gaa aga gaa Val Tyr Leu Gln Gln Gln Leu Gln Ala Tyr Ala Met Glu Arg Glu 1085 1090 1095	3653
aag gta ttt gct gtt ttg aat gag aag act agg gaa aat agc cat Lys Val Phe Ala Val Leu Asn Glu Lys Thr Arg Glu Asn Ser His 1100 1105 1110	3698
cta aaa aca gaa tat cac aaa atg atg gat att gtt gct gcc aag Leu Lys Thr Glu Tyr His Lys Met Met Asp Ile Val Ala Ala Lys 1115 1120 1125	3743
gaa gca gct ctt atc aaa ctg caa gat gaa aat aaa aaa ttg tcc Glu Ala Ala Leu Ile Lys Leu Gln Asp Glu Asn Lys Lys Leu Ser 1130 1135 1140	3788
act aga ttt gaa agt agt ggc caa gat atg ttt aga gaa act att Thr Arg Phe Glu Ser Ser Gly Gln Asp Met Phe Arg Glu Thr Ile 1145 1150 1155	3833
cag aat tta tca cgt atc att cga gaa aaa gac atc gaa ata gat Gln Asn Leu Ser Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Ile Glu Ile Asp 1160 1165 1170	3878
gca cta agt cag aaa tgt cag act tta ttg gca gtt tta caa aca Ala Leu Ser Gln Lys Cys Gln Thr Leu Leu Ala Val Leu Gln Thr 1175 1180 1185	3923

1175		1180		1185	
tcc agc act ggt aat gag gct gga ggt gtt aat agt cat caa ttt	3968				
Ser Ser Thr Gly Asn Glu Ala Gly Gly Val Asn Ser His Gln Phe					
1190		1195		1200	
gag gag ctt cta cag gaa cgt gac aag tta aaa cag caa gta aag	4013				
Glu Glu Leu Leu Gln Glu Arg Asp Lys Leu Lys Gln Gln Val Lys					
1205		1210		1215	
aaa atg gaa gag tgg aag cag cag gtg atg acc aca gta caa aat	4058				
Lys Met Glu Glu Trp Lys Gln Gln Val Met Thr Thr Val Gln Asn					
1220		1225		1230	
atg caa cac gag tca gcc cag ctt cag gaa gag ctt cac caa ctt	4103				
Met Gln His Glu Ser Ala Gln Leu Gln Glu Glu Leu His Gln Leu					
1235		1240		1245	
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 1415	Ile	Lys	Ala	Lys	Ser 1420	Asp	Gln	Leu	Leu	Ser 1425	Ser	Asn	Glu	Asn	
ttc	act	aac	aaa	gta	aat	gaa	aac	gaa	ctt	ttg	agg	cag	gca	gta	4688
Phe 1430	Thr	Asn	Lys	Val	Asn 1435	Glu	Asn	Glu	Leu	Leu 1440	Arg	Gln	Ala	Val	
aca	aac	ctg	aag	gag	aga	ata	tta	att	cta	gag	atg	gac	att	ggc	4733
Thr 1445	Asn	Leu	Lys	Glu	Arg 1450	Ile	Leu	Ile	Leu	Glu 1455	Met	Asp	Ile	Gly	
aaa	cta	aaa	gga	gaa	aat	gaa	aaa	ata	gtg	gaa	aca	tac	agg	gga	4778
Lys 1460	Leu	Lys	Gly	Glu	Asn 1465	Glu	Lys	Ile	Val	Glu 1470	Thr	Tyr	Arg	Gly	
aag	gaa	aca	gaa	tat	caa	gcg	tta	caa	gag	act	aac	atg	aag	ttt	4823
Lys 1475	Glu	Thr	Glu	Tyr	Gln 1480	Ala	Leu	Gln	Glu	Thr 1485	Asn	Met	Lys	Phe	
tct	atg	atg	ctg	cga	gaa	aaa	gag	ttt	gag	tgc	cac	tca	atg	aag	4868
Ser 1490	Met	Met	Leu	Arg	Glu 1495	Lys	Glu	Phe	Glu	Cys 1500	His	Ser	Met	Lys	
gag	aag	gct	ctt	gct	ttt	gaa	cag	cta	ttg	aaa	gag	aaa	gaa	cag	4913
Glu 1505	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe 1510	Glu	Gln	Leu	Leu	Lys 1515	Glu	Lys	Glu	Gln	
ggc	aag	act	gga	gag	tta	aat	cag	ctt	tta	aat	gca	gtt	aaa	tca	4958
Gly 1520	Lys	Thr	Gly	Glu	Leu 1525	Asn	Gln	Leu	Leu	Asn 1530	Ala	Val	Lys	Ser	
atg	cag	gag	aag	aca	gtt	gtg	ttt	caa	cag	gag	aga	gac	caa	gtc	5003
Met 1535	Gln	Glu	Lys	Thr	Val 1540	Val	Phe	Gln	Gln	Glu 1545	Arg	Asp	Gln	Val	
atg	ttg	gcc	ctg	aaa	caa	aaa	caa	atg	gaa	aat	act	gcc	cta	cag	5048
Met 1550	Leu	Ala	Leu	Lys	Gln 1555	Lys	Gln	Met	Glu	Asn 1560	Thr	Ala	Leu	Gln	
aat	gag	gtt	caa	cgt	tta	cgt	gac	aaa	gaa	ttt	cgt	tca	aac	caa	5093
Asn 1565	Glu	Val	Gln	Arg	Leu 1570	Arg	Asp	Lys	Glu	Phe 1575	Arg	Ser	Asn	Gln	
gag	cta	gag	aga	ttg	cgt	aat	cat	ctt	tta	gaa	tca	gaa	gat	tct	5138
Glu 1580	Leu	Glu	Arg	Leu	Arg 1585	Asn	His	Leu	Leu	Glu 1590	Ser	Glu	Asp	Ser	
tat	acc	cgt	gaa	gct	ttg	gct	gca	gaa	gat	aga	gag	gct	aaa	cta	5183
Tyr 1595	Thr	Arg	Glu	Ala	Leu 1600	Ala	Ala	Glu	Asp	Arg 1605	Glu	Ala	Lys	Leu	
aga	aag	aaa	gtc	aca	gta	ttg	gag	gaa	aag	cta	gtt	tca	tcc	tct	5228
Arg 1610	Lys	Lys	Val	Thr	Val 1615	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu 1620	Val	Ser	Ser	Ser	
aat	gca	atg	gaa	aat	gca	agc	cat	caa	gcc	agt	gtg	cag	gta	gag	5273
Asn 1625	Ala	Met	Glu	Asn	Ala 1630	Ser	His	Gln	Ala	Ser 1635	Val	Gln	Val	Glu	
tca	ttg	caa	gaa	cag	ttg	aat	gta	gtt	tcc	aag	caa	agg	gat	gaa	5318
Ser 1640	Leu	Gln	Glu	Gln	Leu 1645	Asn	Val	Val	Ser	Lys 1650	Gln	Arg	Asp	Glu	

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 1700	ctt Leu	ata Ile	gct Ala	gaa Glu	tgg Trp 1705	aag Lys	aaa Lys	aac Asn	gca Ala	gaa Glu 1710	aat Asn	ctg Leu	gaa Glu	gga Gly	5498
aaa Lys 1715	gtg Val	ata Ile	tca Ser	tta Leu	cag Gln 1720	gaa Glu	tgt Cys	ttg Leu	gat Asp	gaa Glu 1725	gca Ala	aat Asn	gct Ala	gca Ala	5543
ttg Leu 1730	gat Asp	tca Ser	gca Ala	tca Ser	aga Arg 1735	ctt Leu	aca Thr	gaa Glu	cag Gln	tta Leu 1740	gat Asp	gta Val	aaa Lys	gaa Glu	5588
gaa Glu 1745	caa Gln	att Ile	gaa Glu	gaa Glu	ctt Leu 1750	aaa Lys	aga Arg	caa Gln	aat Asn	gag Glu 1755	ctc Leu	cga Arg	caa Gln	gaa Glu	5633
atg Met 1760	ctg Leu	gat Asp	gat Asp	gta Val	caa Gln 1765	aag Lys	aaa Lys	ttg Leu	atg Met	agc Ser 1770	tta Leu	gca Ala	aac Asn	agc Ser	5678
tca Ser 1775	gaa Glu	gga Gly	aaa Lys	gta Val	gac Asp 1780	aaa Lys	gtc Val	cta Leu	atg Met	aga Arg 1785	aac Asn	ctc Leu	ttc Phe	att Ile	5723
ggt Gly 1790	cat His	ttc Phe	cac His	aca Thr	ccg Pro 1795	aaa Lys	aat Asn	cag Gln	cgt Arg	cat His 1800	gaa Glu	gtg Val	tta Leu	cgg Arg	5768
tta Leu 1805	atg Met	ggg Gly	agc Ser	atc Ile	ctg Leu 1810	ggc Gly	gtc Val	aga Arg	agg Arg	gag Glu 1815	gag Glu	atg Met	gag Glu	cag Gln	5813
ttg Leu 1820	ttt Phe	cat His	gac Asp	gat Asp	cag Gln 1825	ggc Gly	agt Ser	gtt Val	acc Thr	agg Arg 1830	tgg Trp	atg Met	act Thr	ggg Gly	5858
tgg Trp 1835	ctt Leu	gga Gly	gga Gly	gga Gly	tca Ser 1840	aaa Lys	agt Ser	gtt Val	ccc Pro	aac Asn 1845	aca Thr	cct Pro	ttg Leu	aga Arg	5903
cca Pro 1850	aat Asn	cag Gln	caa Gln	tct Ser	gtg Val 1855	gtt Val	aat Asn	agt Ser	tct Ser	ttt Phe 1860	tca Ser	gaa Glu	ctt Leu	ttt Phe	5948
gtt Val 1865	aaa Lys	ttt Phe	cta Leu	gaa Glu	aca Thr 1870	gaa Glu	tct Ser	cat His	cca Pro	tcc Ser 1875	att Ile	cca Pro	cca Pro	cca Pro	5993
aag Lys 1880	ctt Leu	tct Ser	gtt Val	cat His	gat Asp 1885	atg Met	aaa Lys	cct Pro	ctg Leu	gat Asp 1890	tca Ser	cca Pro	gga Gly	aga Arg	6038

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					
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 ttctaatagc ttttag															6452

<210> 47
 <211> 1979
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <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

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

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

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

Glu	Lys	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Asn	Glu	Lys	Thr	Arg	Glu	Asn	Ser
1100						1105					1110			
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 2 788 152 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
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
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		

5 <210> 48
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 48
 gaagctacaa agcacatg

18

15 <210> 49
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

	<220> <223> cebador	
5	<400> 49 tcctgtcttt cttcatgc	18
10	<210> 50 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 50 catatgtcag tgttcagaa tgc	23
20	<210> 51 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 51 ggtacctact aacctctcag ttc	24
30	<210> 52 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 52 catatgtcag tactgcagaa tgc	23
45	<210> 53 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
50	<400> 53 ggtacctttt attcctttca ctaatc	26
55	<210> 54 <211> 787 <212> PRT <213> <i>Canis familiaris</i>	
	<400> 54	

ES 2 788 152 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	210	215	220	
Val	Arg	Asp	Met	Asp	Met	Asp	Ser	Thr	Leu	Cys	Asp	Leu	Arg	Leu	Thr	225	230	235	240
Leu	Glu	Ala	Lys	Asp	Gln	Glu	Leu	Asn	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Glu	245	250	255	

Ile Leu Val Ala Glu Leu 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 Ser
 275 280 285

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

Asn Lys Arg Val His Gln Leu Glu Asp Asp Lys Lys Asn Met Thr Lys
 305 310 315 320

Glu Leu Asn Val Gln Lys Glu Lys Leu Val Gln Ser Glu Leu Val Leu
 325 330 335

Asn Gly Leu His Leu Ala Lys Gln Lys Leu Glu Glu Lys Val Glu Asp
 340 345 350

Leu Val Asp Gln Leu Asn Lys Ser Gln Lys Ser Asn Leu Asn Met Gln
 355 360 365

Lys Glu Asn Phe Gly Leu Lys Glu His Ile Lys Gln Asn Glu Glu Glu
 370 375 380

Leu Ser Arg Val Arg Asp Glu Leu Thr Gln Ser Leu Ser Arg Asp Ser
 385 390 395 400

Gly Ser Asp Phe Lys Asp Asp Leu Leu Lys Glu Arg Glu Ala Glu Val
 405 410 415

Arg Asn Leu Lys Gln Asn Leu Ser Glu Ile Glu Gln Leu Asn Asp Ser
 420 425 430

Leu Asn Lys Val Ala Phe Asp Leu Lys Met Glu Asn Glu Lys Leu Val
 435 440 445

Leu Ala Cys Glu Asp Ile Arg His Gln Leu Glu Glu Ser Ile Val Gly
 450 455 460

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
 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

ES 2 788 152 T3

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*
<400> 55

5

ES 2 788 152 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	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				

ES 2 788 152 T3

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					
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

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

ES 2 788 152 T3

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
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 57
ctcgagctat tgcttaaaa gggtc 24

25 <210> 58
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

35 <400> 58
catatgtcgt cctggcttgg gggc 24

<210> 59
<211> 25
<212> ADN

ES 2 788 152 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

5

<400> 59

ggtacctgctttaaaggtcttc

25

10

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 un polipéptido que tiene una reactividad para unirse a un anticuerpo contra una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26, 28 o 42 mediante la reacción antígeno-anticuerpo.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un polipéptido es una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 o 42 o un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de no menos del 80 % con la misma.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho cuerpo vivo es un perro, un ser humano o un gato.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, 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 de la SEQ ID NO: 26 o 42.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, 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 de la SEQ ID NO: 28.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 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.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que se lleva a cabo mediante inmunoensayo utilizando como antígeno un polipéptido que consiste en no menos de 500 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 y que comprende no menos de 500 aminoácidos consecutivos localizados 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 de la SEQ ID NO:28 y que comprende no menos de 500 aminoácidos consecutivos localizados en la región de los aminoácidos 1513 a 2325 de la SEQ ID NO:28.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el polipéptido comprende una región de los aminoácidos 1514 a 2339 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26 y consiste en no más de 1000 aminoácidos, o comprende una región de los aminoácidos 1513 a 2325 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:28 y consiste en no más de 1000 aminoácidos.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:35 o 36.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 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.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha muestra es un suero, un plasma, un ascitis o una efusión pleural.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la medición de la expresión del polipéptido se lleva a cabo midiendo el ARNm (o los ARNm) que codifica (o codifican) dicho polipéptido, cuyo ARNm (o cuyos ARNm) puede (o pueden) estar contenido (o contenidos) en la muestra.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, 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; 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 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.
- 5 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende adicionalmente detectar un grado de malignidad del cáncer basado en el nivel de expresión del polipéptido, en donde un nivel de expresión de dicho polipéptido más elevado indica un grado de malignidad más elevado.
- 10 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 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.
- 15 16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, 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.
- 20 17. Uso de un reactivo en un método *in vitro* para la detección de un cáncer (o cánceres), en el que el reactivo comprende un polipéptido antigénico que reacciona de forma inmunológica con, y se une mediante reacción antígeno-anticuerpo a un anticuerpo inducido en un cuerpo vivo contra una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26, 28 o 42.
- 25 18. Uso de un reactivo en un método *in vitro* para la detección de un cáncer (o cánceres), en el que el reactivo comprende un anticuerpo que reacciona de forma inmunológica con una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26, 28 o 42 mediante reacción antígeno-anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 30 19. Un reactivo que comprende un anticuerpo que reacciona de forma inmunológica con una proteína centrosómica que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26, 28 o 42 por reacción antígeno-anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso *in vivo* en un método para la detección de un cáncer (o cánceres).
- 35 20. Uso de un reactivo que comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de no menos del 90 % con una región parcial que consiste en no menos de 18 bases consecutivas de las SEQ ID NO: 25, 27 o 41, o un polinucleótido que tiene una complementariedad de secuencia con la misma en un método *in vitro* para la detección de un cáncer (o cánceres).
- 40

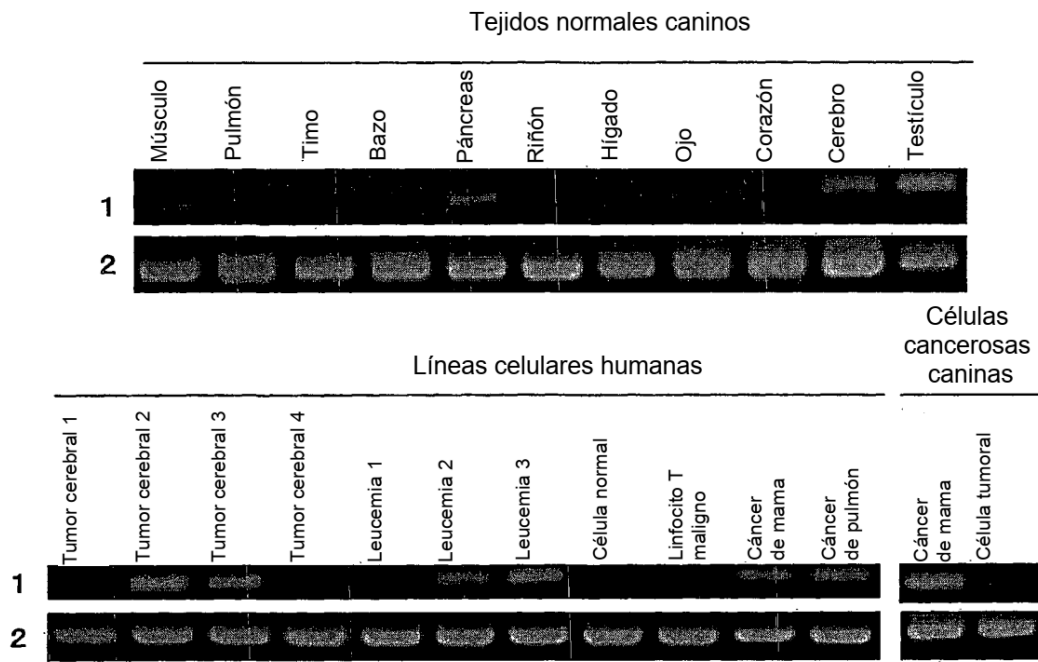


Fig.1

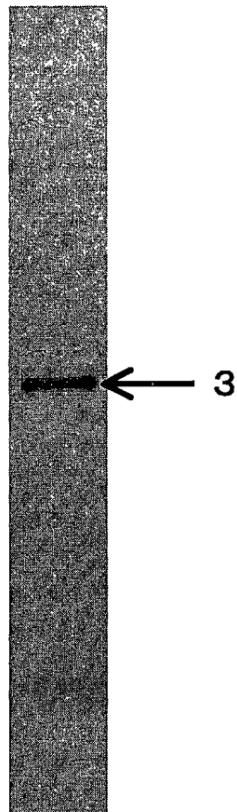


Fig.2

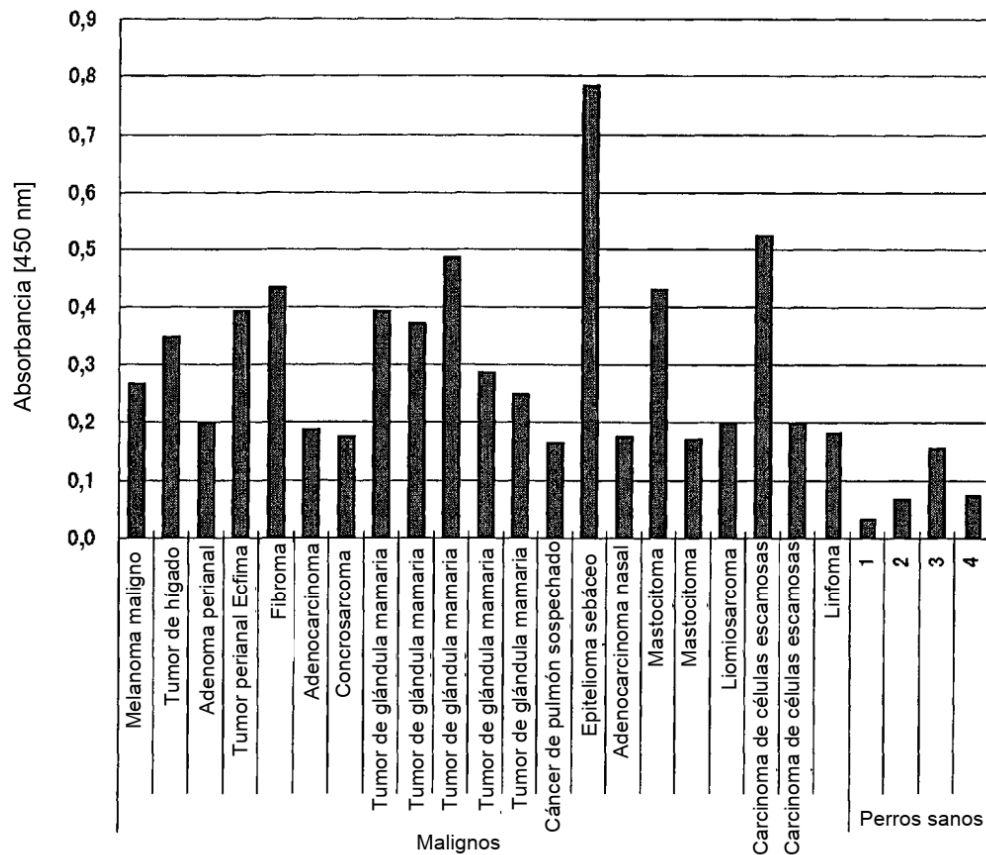


Fig.3

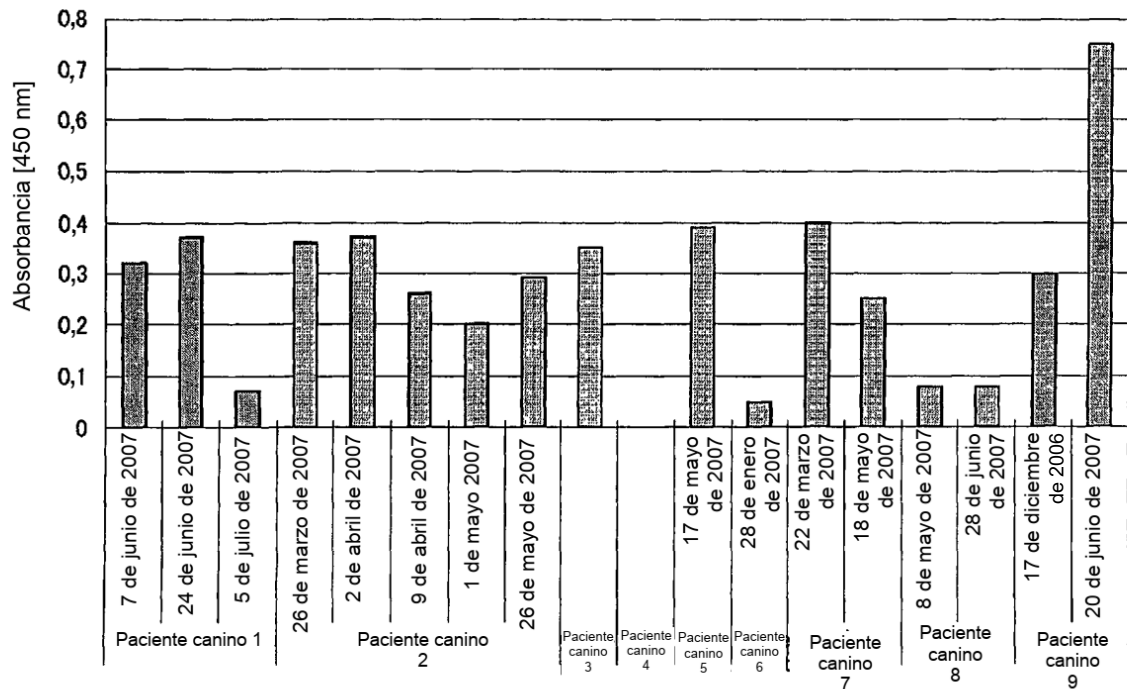


Fig.4

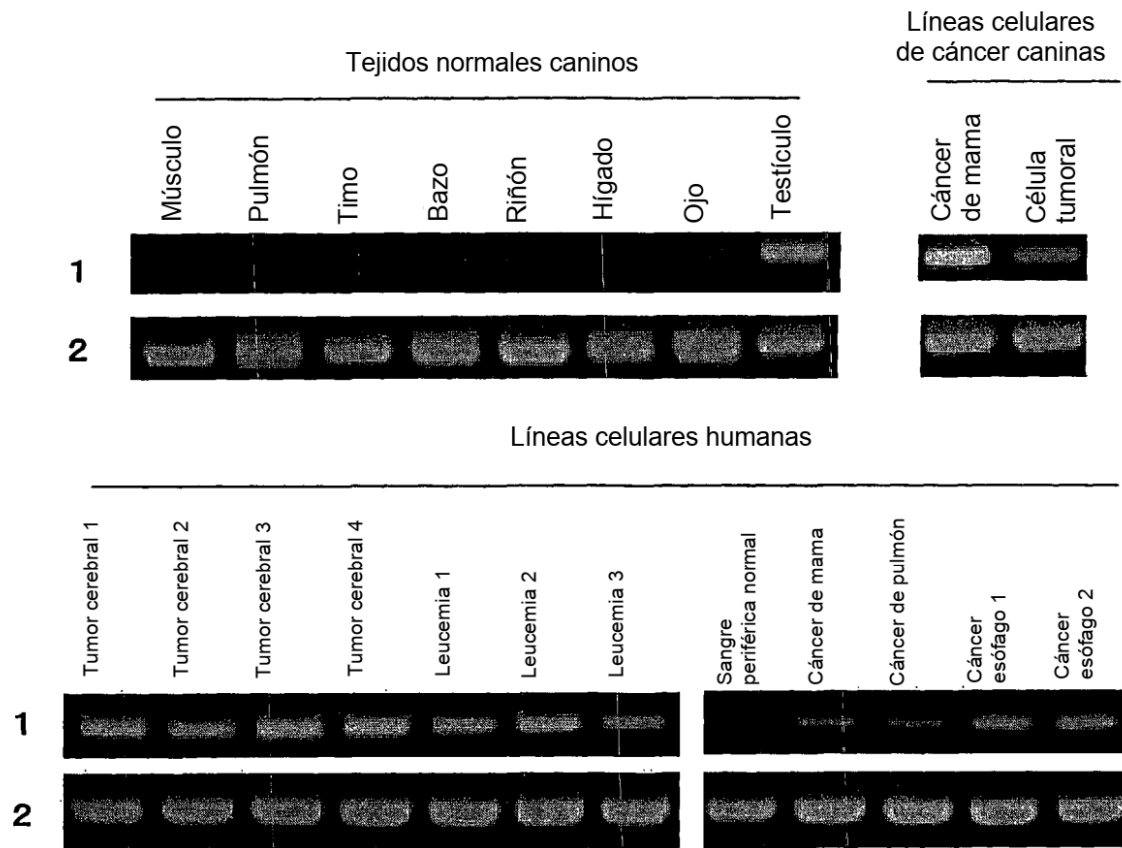


Fig.5

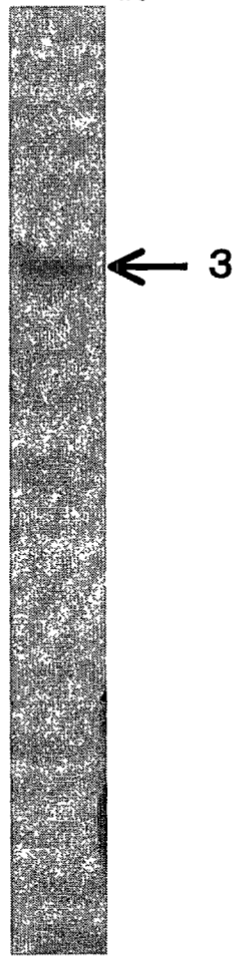


Fig.6

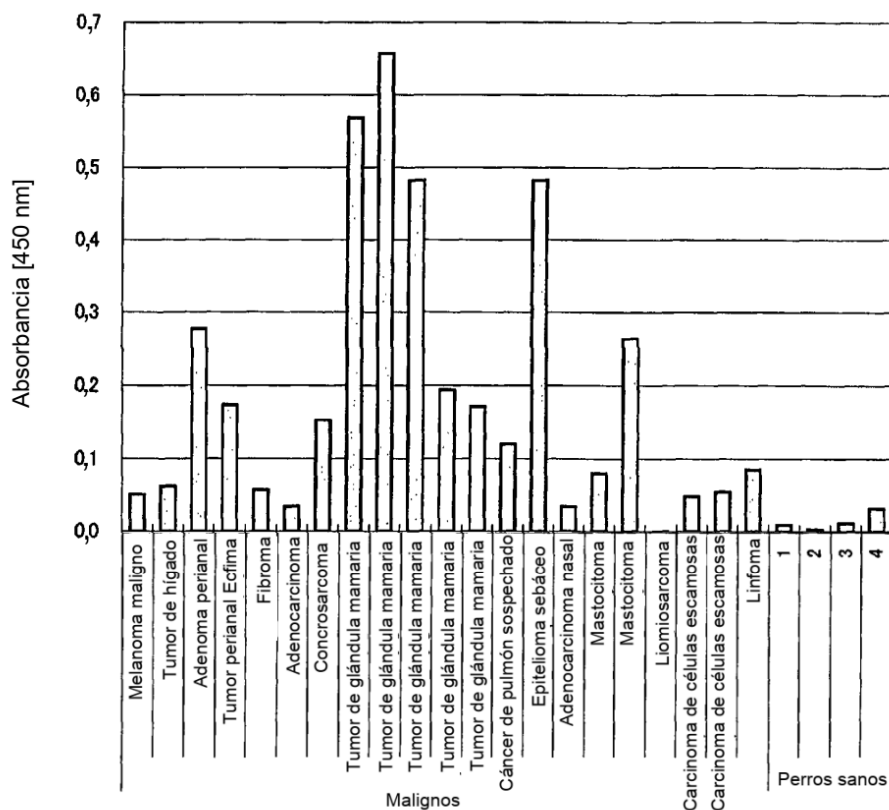


Fig.7

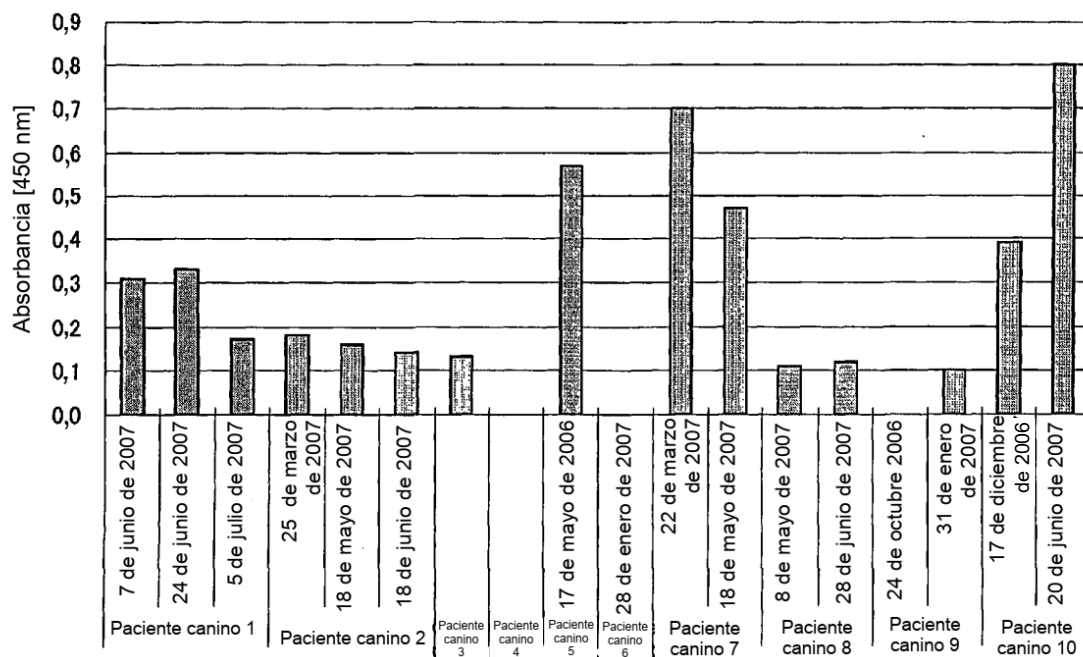


Fig.8

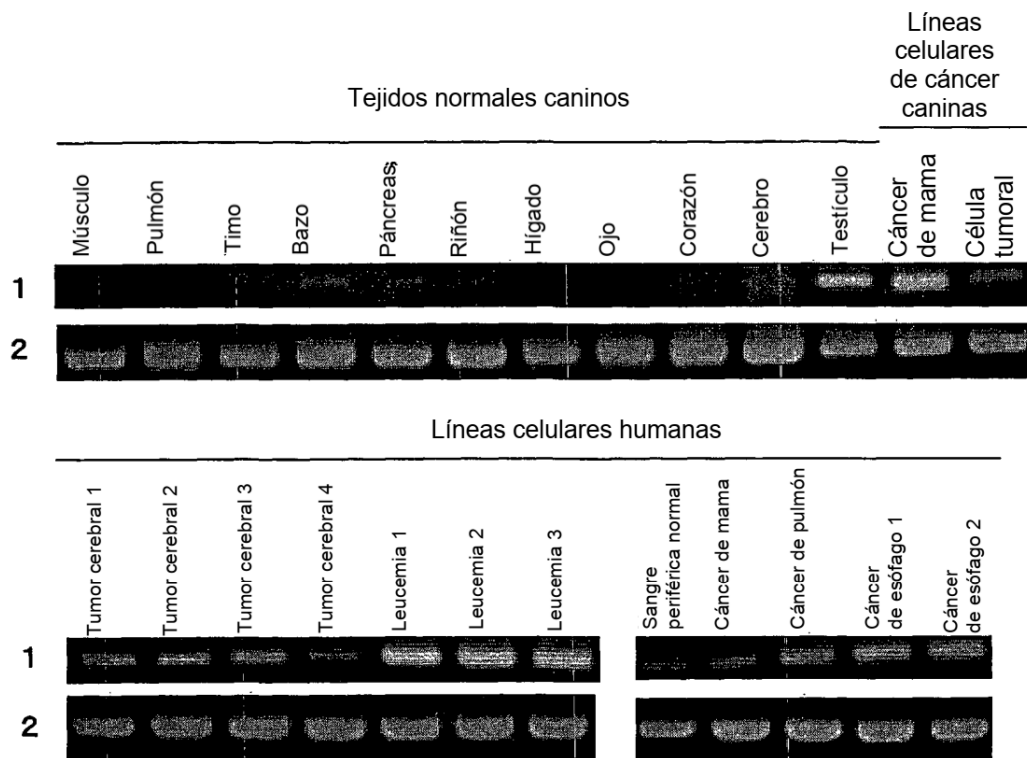


Fig.9

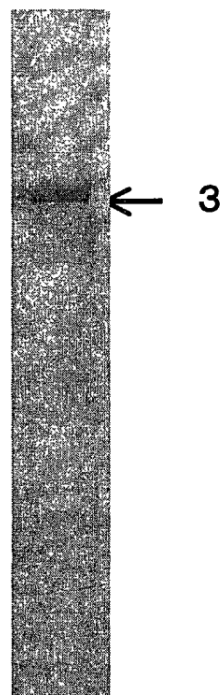


Fig.10

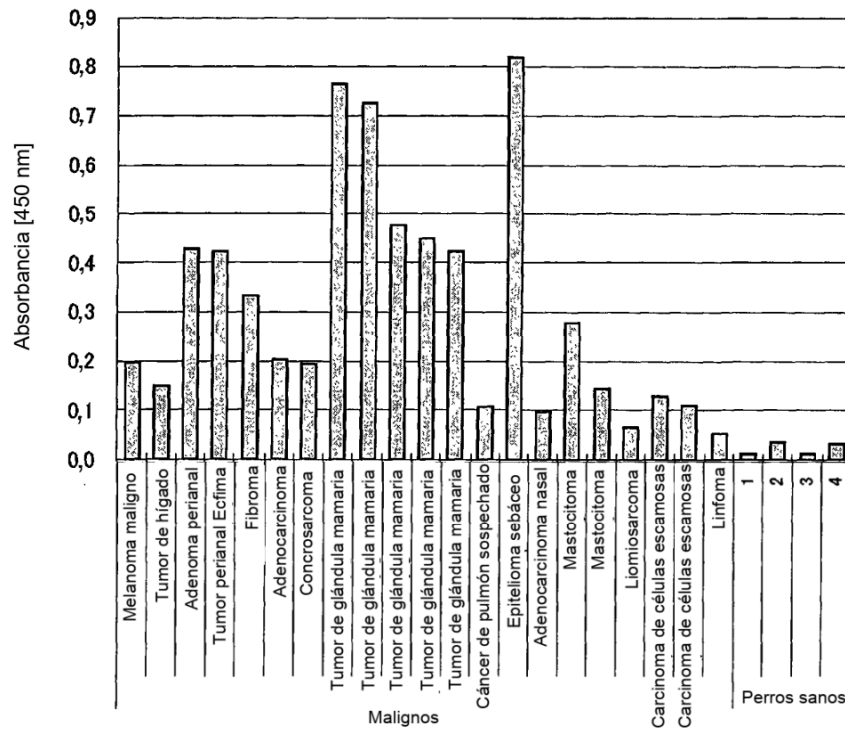


Fig.11

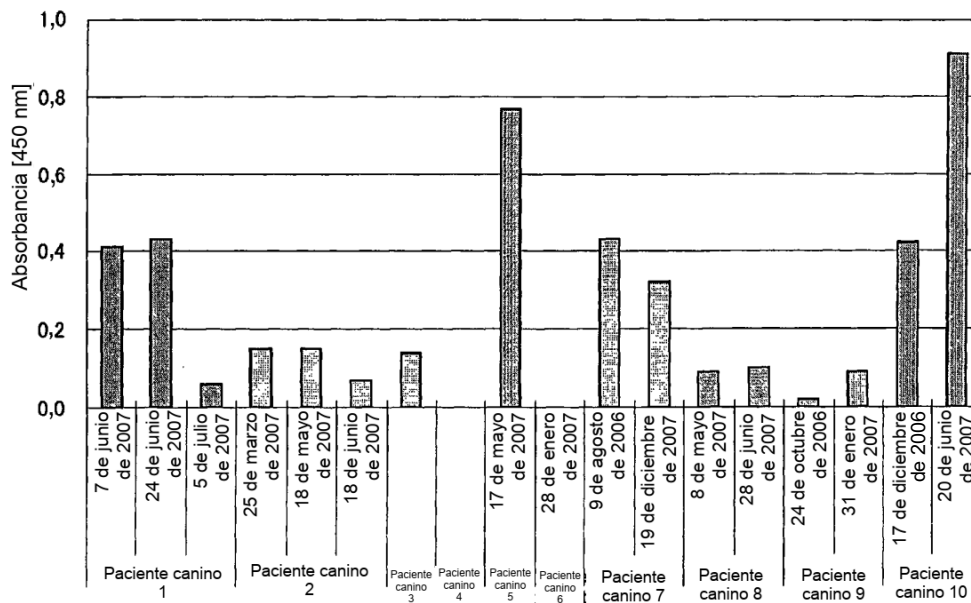


Fig.12

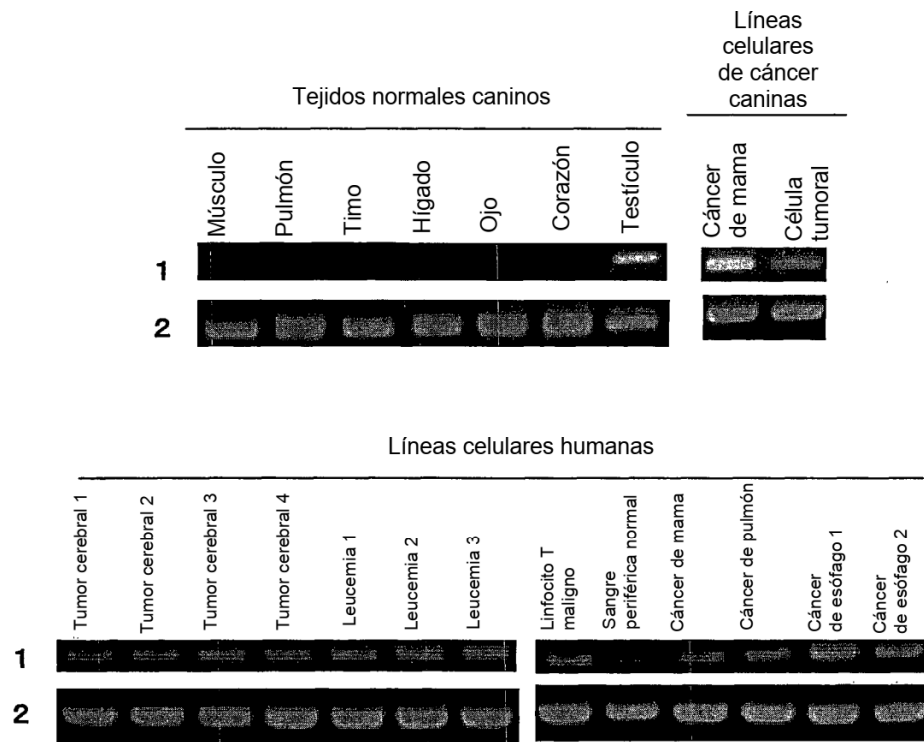


Fig.13

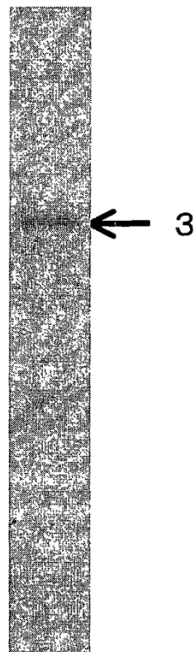


Fig.14

