



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 093**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/51 (2006.01)

C07K 14/495 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99963986 .7**

86 Fecha de presentación : **24.11.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1133558**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2001**

54

Título: **Composiciones y métodos para incrementar la mineralización de la sustancia ósea.**

30

Prioridad: **27.11.1998 US 110283 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73

Titular/es: **UCB, S.A.**
Allee de la Recherche 60
1070 Bruxelles, BE

72

Inventor/es: **Brunkow, Mary, E.;**
Galas, David, J.;
Kovacevich, Brian;
Mulligan, John, T.;
Paepers, Bryan, W.;
Van Ness, Jeffrey y
Winkler, David, G.

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 272 093 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

Composiciones y métodos para incrementar la mineralización de la sustancia ósea.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en general a productos y métodos farmacéuticos, y, más concretamente, a la fabricación de medicamentos y composiciones adecuados para incrementar el contenido mineral del hueso. Tales composiciones y medicamentos pueden ser utilizados para tratar una amplia variedad de condiciones, incluyendo por ejemplo, osteopenia, osteoporosis, fracturas y otros trastornos en los cuales la densidad mineral del hueso es un sello de la enfermedad.

Antecedentes de la invención

15 A lo largo de la vida se pueden producir dos o tres fases distintas de cambios para la masa ósea de un individuo (ver Riggs, *West J. Med.* 154:63-77, 1991). La primera fase se produce tanto en hombres como en mujeres, y prosigue hasta la consecución de una masa ósea pico. Esta primera fase se logra por medio del crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondrales, y del crecimiento radial debido a una tasa de aposición perióstica. La segunda fase comienza alrededor de los 30 años para el hueso trabecular (huesos planos tales como las vértebras y la pelvis) y alrededor de los 40 años para el hueso cortical (v.g., huesos largos encontrados en las extremidades) y continúa durante 20 la edad adulta. Esta fase se caracteriza por una pérdida ósea lenta, y se produce tanto en hombres como en mujeres. En mujeres, también se produce una tercera fase de pérdida de hueso, muy probablemente debido a las deficiencias de estrógenos post-menopáusicas. Solo durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y un 25% del compartimento trabecular (ver Riggs, *supra*).

25 La pérdida de contenido mineral del hueso puede estar causada por una amplia variedad de condiciones, y puede producir problemas médicos significativos. Por ejemplo, la osteoporosis es una enfermedad debilitante en humanos caracterizada por descensos marcados de masa de hueso esquelético y densidad mineral, deterioro estructural del hueso incluyendo la degeneración de la microarquitectura ósea y los correspondientes incrementos de la fragilidad del hueso y la susceptibilidad a la fractura en los individuos afectados. La osteoporosis en humanos está precedida de 30 osteopenia clínica (densidad mineral del hueso que es mayor de una desviación típica pero menor de 2,5 desviaciones típicas por debajo del valor medio para hueso adulto joven), un estado encontrado en aproximadamente 25 millones de personas en los Estados Unidos. Otros 7-8 millones de pacientes en los Estados Unidos han sido diagnosticados de osteoporosis clínica (definida como un contenido mineral del hueso mayor de 2,5 desviaciones típicas por debajo de 35 la del hueso adulto joven maduro). La osteoporosis es una de las enfermedades más costosas para el sistema sanitario, costando decenas de millardos de dólares anualmente en los Estados Unidos. Además de los costes relacionados con el cuidado de la salud, el cuidado residencial a largo plazo y la pérdida de días de trabajo son añadidos a los costes financieros y sociales de esta enfermedad. En todo el mundo aproximadamente 75 millones de personas están en riesgo de osteoporosis.

40 La frecuencia de osteoporosis en la población humana aumenta con la edad, y entre los Caucásicos es predominante en las mujeres (que comprenden el 80% de la reserva de pacientes con osteoporosis en los Estados Unidos). El aumento de fragilidad y susceptibilidad a la fractura del hueso esquelético en las personas de edad se agrava por el mayor riesgo de caídas accidentales en esta población. Se ha informado sobre más de 1,5 millones de fracturas óseas relacionadas con la osteoporosis en los Estados Unidos cada año. Las caderas, muñecas, y vértebras fracturadas están 45 entre las lesiones más comunes asociadas con la osteoporosis. Las fracturas de cadera en particular son extremadamente incómodas y costosas para el paciente, y para las mujeres se correlacionan con elevadas tasas de mortalidad y morbilidad.

50 Aunque la osteoporosis ha sido definida como un incremento del riesgo de fractura debido a un descenso de la masa ósea, ninguno de los tratamientos disponibles en la actualidad para los trastornos óseos puede incrementar sustancialmente la densidad ósea de los adultos. Existe la percepción entre todos los médicos de que se necesitan fármacos que puedan incrementar la densidad ósea en adultos, particularmente en los huesos de la muñeca, la columna vertebral y la cadera que están en riesgo de osteopenia y osteoporosis.

55 Las estrategias actuales para la prevención de la osteoporosis pueden ofrecer algún beneficio pero no pueden asegurar la resolución de la enfermedad. Entre estas estrategias se incluyen la actividad física moderada (particularmente en actividades de soporte de pesos) con el inicio de la edad avanzada, incluyendo calcio adecuado en la dieta, y evitando el consumo de productos que contienen alcohol o tabaco. Para los pacientes que presentan osteopenia clínica u osteoporosis, todos los fármacos terapéuticos y estrategias actuales están dirigidos a reducir adicionalmente la pérdida de masa ósea inhibiendo el proceso de absorción ósea, un componente natural del proceso de remodelación ósea que se produce constitutivamente.

60 Por ejemplo, ahora se están prescribiendo estrógenos para retardar la pérdida de hueso. No obstante, hay cierta controversia sobre si existe un beneficio a largo plazo para los pacientes y si existe algún efecto en todos los pacientes de más de 75 años de edad. Por otra parte, se cree que el uso de estrógenos aumenta el riesgo de cáncer de mama o endometrio.

ES 2 272 093 T3

También se han sugerido dosis elevadas de calcio en la dieta, con o sin vitamina D para mujeres post-menopáusicas. No obstante, a menudo las dosis elevadas de calcio tienen efectos secundarios gastrointestinales desagradables, y los niveles de calcio en suero deben ser controlados continuamente (ver Khosla y Riggs, *Mayo Clin. Proc.* 70:978-982, 1995).

Entre otros agentes terapéuticos que han sido sugeridos se incluyen calcitonina, bifosfonatos, esteroides anabólicos y fluoruro de boro. Tales agentes terapéuticos sin embargo, tienen efectos secundarios no deseables (v.g., la calcitonina y los esteroides pueden causar náuseas y provocar una reacción inmunitaria, los bifosfonatos y el fluoruro de sodio pueden inhibir la reparación de las fracturas, incluso aunque la densidad ósea aumente moderadamente) que pueden evitar su uso (ver Khosla y Riggs, *supra*).

Las entradas AA393939 y AII1311 de la base de datos EMBL tienen que ver con Expressed Sequence Tags (EST) para las cuales no está indicada la función.

Ninguna estrategia terapéutica puesta en práctica en la actualidad implica un fármaco que estimule o intensifique el crecimiento de nueva masa ósea. La presente invención proporciona composiciones para la fabricación de medicamentos que pueden ser utilizados para incrementar la mineralización ósea, y de este modo pueden ser utilizadas para tratar una amplia variedad de condiciones en las que se desea incrementar la masa ósea. Adicionalmente, la presente invención proporciona otras ventajas relacionadas.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una clase o familia novedosa de proteínas de unión al TGF-beta, así como análisis para seleccionar compuestos que incrementan el contenido mineral del hueso y la densidad mineral del hueso, compuestos que incrementan el contenido mineral del hueso y la densidad mineral del hueso y la utilización de tales compuestos en la fabricación de medicamentos para el tratamiento o la prevención de una amplia variedad de condiciones.

La invención proporciona un ácido nucleico aislado seleccionado del grupo formado por:

- (a) una molécula de ácido nucleico aislada que comprende el SEQ ID NO. 1, 5, 9, 11, 13 o 15, o una secuencia complementaria de la misma;
- (b) una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida específicamente con la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas donde la hibridación se realiza en 5 x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C; y
- (c) un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de unión al TGF-beta según (a) y (b); donde el ácido nucleico no es el ácido nucleico de cualquiera de los números de acceso AC003098, AA393939 y AII13131 de la base de datos EMBL.

Dentro de los aspectos relacionados de la presente invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas basadas en la hibridación a una porción solamente de una de las secuencias identificadas antes (v.g., para (a) la hibridación puede ser con una sonda de al menos 20, 25, 50 o 100 nucleótidos seleccionados entre los nucleótidos 156 a 539 o 555 a 687 del SEQ ID NO. 1). Como debe resultar fácilmente evidente, las condiciones restrictivas necesarias que se van a utilizar para la hibridación pueden variar basándose en el tamaño de la sonda. Por ejemplo, para una sonda de 25-meros entre las condiciones muy restrictivas se podrían incluir Tris 60 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, 5x solución de Denhardt, 6x SSC, N-laurilsarcosina al 0,1% (p/v), NP-40 al 0,5% (p/v) (nonidet P-40) durante la noche a 45 grados centígrados, seguido de dos lavados con 0,2x SSC/SDS al 0,1% a 45-50 grados. Para una sonda de 100-meros en condiciones poco restrictivas, entre las condiciones adecuadas se podrían incluir las siguientes: 5x SSPE, 5x Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche a 42-50 grados, seguido de dos lavados con 2x SSPE (o 2x SSC)/SDS al 0,1% a 42-50 grados.

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen homología con los SEC de ID Núms. 1, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, a un nivel de homología del 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o 98% utilizando un algoritmo de Wibur-Lipman. Entre los ejemplos representativos de tales moléculas de ácido nucleico aisladas se incluyen, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que comprende las Secuencias de ID Núms. 2, 6, 10, 12, 14, o 16, o tienen homología con estas secuencias a un nivel del 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95%, o 98% de nivel de homología utilizando un algoritmo de Lipman-Pearson.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas tienen típicamente un tamaño de menos de 100 kb, y en ciertas realizaciones, menos de 50 kb, 25 kb, 10 kb, o incluso 5 kb de tamaño. Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico aisladas, en otras realizaciones, no existen en una "genoteca" de otras moléculas de ácido nucleico no relacionado (v.g., un subclon BAC tal como se describe en el Núm. de Acceso de GenBank AC003098 y el Núm. EMB AQ171546). No obstante, las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden ser encontradas en genotecas de moléculas relacionadas (v.g., para transposición genética, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.837.458, 5.830.721; y 5.811.238). Finalmente, las moléculas de ácido nucleico aisladas como se describen aquí no incluyen

moléculas de ácido nucleico que codifican Dan, Cerberus, Gremlin, o SCGF (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.780.263).

5 También son proporcionados por la presente invención vectores de clonación que contienen las moléculas de ácido nucleico indicadas antes, y vectores de expresión que comprenden un promotor (v.g., una secuencia reguladora) conectada operablemente a una de las moléculas de ácido nucleico indicada antes. Entre los ejemplos representativos de los promotores adecuados se incluyen promotores específicos de tejidos, y promotores basados en virus (v.g., promotores basados en CMV tales como 1-E de CMV, el promotor temprano de SV40, y LTR de MuLV). Los vectores de expresión también pueden estar basados en, o derivados de virus (v.g., un “vector viral”). Entre los ejemplos representativos de los vectores virales se incluyen los vectores virales del herpes simplex, los vectores adenovirales, los vectores virales asociados con adenovirus y los vectores retrovirales. También se proporcionan células huésped que contienen o que comprenden cualquiera de los vectores indicados antes (incluyendo por ejemplo, células huésped de origen humano, de mono, de perro, de rata, o de ratón).

15 En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan métodos de producción de proteínas de unión al TGF-beta, que comprenden la etapa de cultivar la célula huésped anteriormente mencionada que contiene el vector en unas condiciones y durante un tiempo suficiente para producir la proteína de unión al TGF-beta. En realizaciones adicionales, la proteína producida mediante este método puede ser purificada adicionalmente (v.g., mediante cromatografía en columna, purificación de afinidad, y similares). Por tanto, las proteínas aisladas que son codificadas por las moléculas de ácido nucleico indicadas antes (v.g., Secuencias de ID Núms. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16) pueden ser fácilmente producidas dada la descripción de la solicitud sujeto.

25 Asimismo se debe observar que las proteínas mencionadas antes, o fragmentos de las mismas, pueden ser producidas como proteínas de fusión. Por ejemplo, en un aspecto se proporcionan proteínas de fusión que comprenden un primer segmento polipeptídico de una proteína de unión al TGF-beta codificada por una molécula de ácido nucleico como se ha descrito antes, o una porción de la misma de al menos 10, 20, 30, 50, o 100 aminoácidos de longitud, y un segundo segmento polipeptídico que comprende una proteína que no es de unión al TGF-beta. En ciertas realizaciones, el segundo polipéptido puede ser una etiqueta adecuada para la purificación o el reconocimiento (v.g., un polipéptido que comprende múltiples restos aminoácido aniónicos - ver la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.851.341), un marcador (v.g., la proteína verde fluorescente, o la fosfatasa alcalina), o una molécula tóxica (v.g., ricino).

35 En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a la clase descrita antes de las proteínas de unión al TGF-beta (v.g., BEER humana). En varias realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, o un anticuerpo monoclonal (v.g., humano o de origen de ratón). En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo que conserva las características de unión de un anticuerpo completo (v.g., un fragmento F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, o Fv, o incluso una CDR). Asimismo se proporcionan hibridomas y otras células que son capaces de producir o expresar los anticuerpos anteriormente mencionados.

40 En aspectos relacionados de la invención, se proporcionan métodos que detectan una proteína de unión al TGF-beta, que comprenden las etapas de incubar un anticuerpo como se ha descrito antes en unas condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo se una a una proteína de unión al TGF-beta, y detectar la unión. En varias realizaciones el anticuerpo puede ser unido a un soporte sólido para facilitar el lavado o la separación, y/o marcado (v.g., con un marcador seleccionado del grupo formado por las enzimas, las proteínas fluorescentes, y los radioisótopos).

50 En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan oligonucleótidos aislados que hibridan con una molécula de ácido nucleico según los SEC ID Núms. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, o 18 o su complemento, en condiciones muy restrictivas. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido puede ser encontrado en la secuencia que codifica los SEC ID Núms. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, o 16. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido tiene una longitud de al menos 15, 20, 30, 50, o 100 nucleótidos. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido está marcado con otra molécula (v.g., una enzima, molécula fluorescente, o radioisótopo). Asimismo se proporcionan cebadores que son capaces de amplificar específicamente toda o una porción de las moléculas de ácido nucleico mencionadas antes que codifican proteínas de unión de TGF-beta. Según se utiliza aquí, se debe entender que el término “amplificar específicamente” hace referencia a cebadores que amplifican las proteínas de unión al TGF-betas mencionadas antes, y no otras proteínas de unión al TGF-beta tales como Dan, Cerberus, Gremlin, o SCGF (patente de los Estados Unidos Núm. 5.780.263).

60 En aspectos relacionados de la presente invención, se proporcionan métodos para detectar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión al TGF-beta, que comprende las etapas de incubar un oligonucleótido como se ha descrito antes en condiciones muy restrictivas, y detectar la hibridación de dicho oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede estar marcado y/o unido a un soporte sólido.

65 En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan ribozimas que son capaces de escindir ARN que codifica una de las proteínas de unión al TGF-beta (v.g. SEC ID Núms. 2, 6, 8, 10, 12, 14, o 16). Tales ribozimas pueden estar compuestas por ADN, ARN (incluyendo ácidos 2'-O-metilribonucleicos), análogos de ácido nucleico (v.g., ácidos nucleicos que tienen enlaces fosforotioato) o mezclas de los mismos. Asimismo se proporcionan moléculas de ácido nucleico (v.g., ADN o ADNc) que codifican estas ribozimas, y vectores que son capaces de expresar o producir

las ribozimas. Entre los ejemplos representativos de los vectores se incluyen plásmidos, retrotransposones, cósmidos, y vectores basados en virus (v.g., vectores virales generados al menos en parte a partir de un retrovirus, adenovirus, o virus adeno-asociado). También se proporcionan células huésped (v.g., células humanas, de perro, de rata o de ratón) que contienen estos vectores. En ciertas realizaciones, la célula huésped puede ser transformada establemente con el vector.

En aspectos adicionales de la invención, se proporcionan métodos para producir ribozimas o bien sintéticamente, o bien mediante transcripción *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones adicionales, las ribozimas así producidas pueden ser purificadas adicionalmente y/o formuladas en composiciones farmacéuticas (v.g., la ribozima o la molécula de ácido nucleico que codifica la ribozima junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable). De un modo similar, los oligonucleótidos antisentido y los anticuerpos u otras moléculas seleccionadas descritas aquí pueden ser formuladas en composiciones farmacéuticas.

En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan oligonucleótidos antisentido que comprenden una molécula de ácido nucleico que hibrida con una molécula de ácido nucleico según los SEC ID Núms. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, o 15, o el complemento de esta, y donde dicho oligonucleótido inhibe la expresión de la proteína de unión al TGF-beta como se describe aquí (v.g., BEER humana). En diversas realizaciones, el oligonucleótido tiene una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50 nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido tiene menos de 100, 75 o 60 nucleótidos de longitud. Como debe resultar fácilmente evidente, el oligonucleótido puede constar de uno o más análogos de ácido nucleico, ácidos ribonucleicos, o ácidos desoxirribonucleicos. Adicionalmente, el oligonucleótido puede ser modificado por uno o más enlaces, incluyendo por ejemplo, enlaces covalentes tales como un enlace fosforotioato, un enlace fosfotriéster, un enlace metilfosfonato, un enlace metilen(imino), un enlace morfolino, un enlace amido, un enlace poliamido, un enlace interazúcar alquílico de cadena corta, un enlace interazúcar cicloalquílico, un enlace interazúcar heteroatómico de cadena corta y un enlace interazúcar heterocíclico. Un ejemplo representativo de un oligonucleótido quimérico es proporcionado en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.989.912.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona el uso de una ribozima como se ha descrito antes en la fabricación de un medicamento para incrementar la mineralización ósea en un animal de sangre caliente donde el medicamento introduce una cantidad efectiva de ribozima en el animal. En aspectos relacionados, tales medicamentos introducen en un paciente una cantidad efectiva de la molécula de ácido nucleico o vector descritos aquí que es capaz de producir la ribozima deseada, siendo introducido el medicamento en condiciones que favorecen la transcripción de la molécula de ácido nucleico para producir la ribozima.

En otros aspectos de la invención se proporcionan animales no humanos, transgénicos. En una realización se proporciona un animal transgénico cuyas células germinales y células somáticas contienen una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión al TGF-beta como se ha descrito antes que está conectada operablemente a un promotor efectivo para la expresión del gen, siendo introducido el gen en el animal, o ancestro del animal, en una fase embrionaria, con la condición de que dicho animal no sea humano. En otras realizaciones, se proporcionan animales modificados genéticamente transgénicos, que comprenden un animal cuyas células germinales y células somáticas comprenden una desorganización de al menos un alelo de una molécula de ácido nucleico endógena que hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión al TGF-beta como se ha descrito aquí, donde la desorganización evita la transcripción del ARN mensajero a partir de dicho alelo en comparación con un animal sin la desorganización, con la condición de que el animal no sea un humano. En varias realizaciones, la desorganización es una delección, sustitución o inserción en el ácido nucleico. En otras realizaciones el animal transgénico es un ratón, rata, oveja, cerdo o perro.

En aspectos adicionales de la invención, se proporcionan estuches para la detección de la expresión de la proteína de unión al TGF-beta, que comprenden un recipiente que comprende una molécula de ácido nucleico, donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo formado por (a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de los SEC ID Núms. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15; (b) una molécula de ácido nucleico que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a); (c) una molécula de ácido nucleico que es un fragmento de (a) o (b) de al menos 15, 20, 30, 50, 75, o 100 nucleótidos de longitud. Asimismo se proporcionan estuches para la detección de una proteína de unión al TGF-beta que comprenden un recipiente que comprende uno de los anticuerpos para la proteína de unión al TGF-beta descritos aquí.

Por ejemplo, en un aspecto de la presente invención se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprenden las etapas de (a) mezclar una o más moléculas candidato con la proteína de unión al TGF-beta codificada por la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 y un miembro seleccionado de la familia de proteínas del TGF-beta (v.g., BMP 5 o 6), (b) determinar si la molécula candidato altera la señalización del miembro de la familia del TGF-beta, altera o unión de la proteína de unión al TGF-beta al miembro de la familia del TGF-beta. En ciertas realizaciones, la molécula altera la capacidad de TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima. En este aspecto de la presente invención, la molécula o las moléculas candidato pueden alterar la señalización o la unión, por ejemplo, disminuyendo (v.g., inhibiendo), o incrementando (v.g., intensificando) la señalización o la unión.

En otro aspecto más, se proporcionan los métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, comprendiendo la etapa de determinar si una molécula seleccionada inhibe la unión de la proteína de unión al TGF-beta al hueso, o un análogo de la misma. Entre los ejemplos representativos

ES 2 272 093 T3

de hueso o de los análogos del mismo se incluyen hidroxiapatita y muestras de hueso humano primario obtenidas mediante biopsia.

5 En ciertas realizaciones de los métodos citados antes, la molécula seleccionada está contenida en una mezcla de moléculas y los métodos pueden comprender adicionalmente la etapa de aislar una o más moléculas que son funcionales en el análisis. En otras realizaciones más, la familia de proteínas del TGF-beta está unida a un soporte sólido y se mide la unión de la proteína de unión al TGF-beta o las proteínas de unión al TGF-beta están unidas a un soporte sólido y se mide la unión de las proteínas de unión al TGF-beta.

10 Utilizando métodos tales como los descritos antes, se pueden analizar una amplia variedad de moléculas en cuanto a su capacidad para incrementar el contenido mineral del hueso inhibiendo la unión de la proteína de unión al TGF-beta a la familia de las proteínas de TGF-beta. Entre los ejemplos representativos de tales moléculas se incluyen proteínas o péptidos, moléculas orgánicas, y moléculas de ácido nucleico.

15 En otros aspectos relacionados la invención proporciona el uso de una molécula identificada a partir de los análisis citados aquí en la fabricación de un medicamento que incrementa el contenido mineral del hueso en un animal de sangre caliente, donde los medicamentos administran a un animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula identificada a partir de los análisis citados aquí. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión al TGF-beta a la súper-familia de proteínas del TGF-beta, incluyendo las proteínas morfogénicas del hueso (BMP), en la fabricación de un medicamento para incrementar el contenido mineral del hueso en un animal de sangre caliente. Los medicamentos proporcionan una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula. Entre los ejemplos representativos de las moléculas adecuadas se incluyen moléculas antisentido, ribozimas, genes de ribozimas y anticuerpos (v.g., un anticuerpo humanizado) que reconocen específicamente y alteran la actividad de la proteína de unión al TGF-beta.

25 En otro aspecto la presente invención proporciona el uso de células que buscan el hueso y que han tenido un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión al TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta y proteínas morfogénicas del hueso (BMP) introducidas en ellas, en la fabricación de un medicamento para incrementar el contenido mineral del hueso en un animal de sangre caliente. Según se utiliza aquí, se debe entender que las "células buscan el hueso" si localizan la matriz del hueso después de la administración periférica. En una realización, la invención comprende adicionalmente, antes de la etapa de introducción, el aislamiento de células de la médula del hueso que buscan el hueso. En una realización adicional, las células que buscan el hueso se seleccionan del grupo formado por las células CD34+ y los osteoblastos.

35 En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan moléculas (preferiblemente aisladas) que inhiben la unión de la proteína de unión al TGF-beta a la súper-familia de proteínas del TGF-beta.

40 En realizaciones adicionales, las moléculas pueden ser proporcionadas en forma de una composición, y pueden comprender adicionalmente un inhibidor de la resorción ósea. Entre los ejemplos representativos de tales inhibidores se incluyen calcitonina, estrógeno, un bisfosfonato, un factor de crecimiento que tenga actividad anti-resorción y tamoxifeno.

45 Entre los ejemplos representativos de las moléculas que pueden ser utilizadas en los contextos terapéuticos anteriormente mencionados se incluyen, v.g., ribozimas, genes de ribozimas, moléculas antisentido, y/o anticuerpos (v.g., anticuerpos humanizados). Tales moléculas pueden ser utilizadas, dependiendo de su selección, para alterar, ejercer un efecto antagonístico o ejercer un efecto agonístico de la señalización o la unión de un miembro de la familia de proteínas de unión al TGF-beta como se ha descrito aquí.

50 Con varias realizaciones de la invención, las moléculas y medicamentos descritos antes para el tratamiento o la prevención pueden ser utilizados en condiciones tales como osteoporosis, osteomalasia, enfermedad periodontal, escorbuto, Enfermedad de Cushing, fractura de huesos y condiciones debidas a la inmovilización de miembros y uso de esteroides.

55 Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos. Además, se muestran aquí diversas referencias que describen con más detalle ciertos procedimientos o composiciones (v.g., plásmidos, etc.)

Breve descripción de los dibujos

60 La Figura 1 es una ilustración esquemática que compara la secuencia de aminoácidos de Dan Humana; Gremlin Humana; Cerberus Humana y Beer Humana. Las flechas indican el esqueleto de Cisteína.

65 La Figura 2 resume los resultados obtenidos partir de la inspección de una variedad de tejidos humanos para la expresión de un gen de la proteína de unión al TGF-beta, específicamente, el gen Beer Humano. Se utilizó un procedimiento de transcripción Inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa semi-cuantitativo (RT-PCR) para amplificar una porción del gen de ADNc de la primera hebra sintetizada a partir del ARN total (descrito con más detalle en el Ejemplo 2A).

La Figura 3 resume los resultados obtenidos a partir del ARN la hibridación *in situ* de secciones de embrión de ratón, utilizando una sonda de ARNc que es complementaria al transcrito Beer de ratón (descrito con más detalle en el Ejemplo 2B). El panel A es una sección transversal de embriones de 10,5 dpc. El panel B es una sección sagital de embriones de 12,5 dpc y los paneles C y D son secciones sagitales de embriones de 15,5 dpc.

La Figura 4 ilustra, mediante análisis de transferencia western, la especificidad de tres anticuerpos policlonales diferentes para sus respectivos antígenos (descrito con más detalle en el Ejemplo 4). La Figura 4A muestra la reactividad específica de un anticuerpo anti-H. Beer para el antígeno H. Beer, pero no H. Dan o H. Gremlin. La Figura 4B muestra la reactividad de un anticuerpo anti-H. Gremlin para el antígeno H. Gremlin, pero no H. Beer o H. Dan. La Figura 4C muestra la reactividad de un anticuerpo anti-H. Dan para H. Dan, pero no para H. Beer o H. Gremlin.

La Figura 5 ilustra, mediante análisis de transferencia western, la selectividad de la proteína de unión al TGF-beta, Beer, para BMP-5 y BMP-6, pero no BMP-4 (descrito con más detalle en el Ejemplo 5).

La Figura 6 demuestra que la interacción iónica entre la proteína de unión al TGF-beta, Beer, y BMP-5 tiene una constante de disociación en el intervalo de 15-30 nM.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de exponer la invención con detalle, puede servir de ayuda para la comprensión de la misma mostrar las definiciones de ciertos términos y enumerar y definir las abreviaturas que se utilizarán más adelante.

Se debe entender que “*molécula*” incluye proteínas o péptidos (v.g., anticuerpos, pares de unión recombinantes, péptidos con una afinidad de unión deseada), ácidos nucleicos (v.g., ADN, ARN, moléculas de ácido nucleico quiméricas, y análogos de ácidos nucleicos tales como PNA); y compuestos orgánicos e inorgánicos.

Se debe entender que “*TGF-beta*” incluye cualquier miembro conocido o novedoso de la súper-familia del TGF-beta, lo que también incluye las proteínas morfogénicas del hueso (BMP).

Se debe entender que “*receptor del TGF-beta*” hace referencia al receptor específico para un miembro concreto de la súper-familia del TGF-beta (incluyendo las proteínas morfogénicas del hueso (BMP)).

Se debe entender que “*proteína de unión al TGF-beta*” hace referencia a una proteína con una afinidad de unión específica para un miembro concreto o subgrupo de miembros de la super-familia del TGF-beta (incluyendo las proteínas morfogénicas del hueso (BMP)). Entre los ejemplos específicos de las proteínas de unión al TGF-beta se incluyen las proteínas codificadas por las Secuencias de ID Núms. 1, 5, 7, 9, 11, 13 y 15.

Se debe entender que “*la unión de la proteína de unión al TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta y las proteínas morfogénicas del hueso (BMP)*” hace referencia a moléculas que permiten la activación de TGF-beta o proteínas morfogénicas del hueso (BMP), o permiten la unión de miembros de la familia del TGF-beta incluyendo las proteínas morfogénicas del hueso (BMP) a sus respectivos receptores, separando o evitando la unión del TGF-beta con la proteína de unión al TGF-beta. Semejante inhibición puede ser completada, por ejemplo, mediante moléculas que inhiben la unión de la proteína de unión al TGF-beta a miembros específicos de la súper-familia del TGF-beta.

“*Vector*” hace referencia a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de la proteína deseada. El vector debe incluir elementos promotores transcripcionales que estén conectados operablemente al gen o los genes de interés. El vector puede constar de ácidos desoxirribonucleicos (“ADN”), ácidos ribonucleicos (“ARN”), o una combinación de los dos (v.g. quimérico de ADN-ARN). Opcionalmente, el vector puede incluir una secuencia de poliadenilación, uno o más sitios de restricción, así como uno o más marcadores seleccionables tales como neomicina-fosfotransferasa o higromicina-fosfotransferasa. Adicionalmente, dependiendo de la célula huésped elegida y del vector empleado, también se pueden incorporar otros elementos genéticos tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ácidos nucleicos adicionales, intensificadores, secuencias que confieran inducibilidad de transcripción, y también se pueden incorporar marcadores seleccionables en los vectores descritos aquí.

Una “*molécula de ácido nucleico aislada*” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica una proteína de unión al TGF que ha sido separada del ADN genómico de una célula eucariótica es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma del organismo. La molécula de ácido nucleico aislada puede ser de ADN genómico, ADNc, ARN, o constar de al menos una parte de análogos de ácido nucleico.

Un “*polipéptido aislado*” es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. En ciertas realizaciones, una separación de proteínas concreta contiene un polipéptido aislado si éste aparece nominalmente como una única banda sobre el gel de SDS-PAGE con tinción de Azul Coomassie. “*Aislado*” cuando se refiere

a moléculas orgánicas significa que los compuestos son puros en más del 90 por ciento utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica (v.g., RMN, punto de fusión).

5 “*Esclerosteosis*”. Esclerosteosis es un término que fue aplicado por Hansen (1967) (Hansen, H.G., Sklerosteose. En: Opitz, H., Schmid, F., Handbuch der Kinderheilkunde. Berlín: Springer (pub.) 6 1967. págs. 351-355) a un trastorno similar a hiperostosis cortical generalizada de van Buchem pero posiblemente difiriendo en la apariencia radiológica de los cambios del hueso y en la presencia de sindactilia cutánea asimétrica de los dedos índice y medio en muchos casos. La mandíbula tiene una apariencia inusualmente cuadrada en esta afección.

10 Los “*anticuerpos humanizados*” son proteínas recombinantes en las cuales las regiones determinantes de la complementariedad de ratón de los anticuerpos monoclonales han sido transferidas de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano.

15 Según se utiliza aquí, un “*fragmento de anticuerpo*” es una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', y similar. Sin tener en cuenta la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo monoclonal para la proteína de unión al TGF-beta se une con un epítipo de la proteína de unión al TGF-beta.

20 El término “*fragmento de anticuerpo*” también incluye cualquier proteína sintética o diseñada genéticamente que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen fragmentos aislados que constan de la región variable de la cadena ligera, fragmentos “Fv” que constan de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, moléculas polipeptídicas de una única cadena recombinante en las cuales las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un conector peptídico (“proteínas sFv”), y unidades de reconocimiento mínimas que constan de los restos aminoácido que imitan la región hipervariable.

30 Una “*marca detectable*” es una molécula o átomo que puede ser conjugada con un radical de un anticuerpo para producir una molécula útil para las diagnosis. Entre los ejemplos de las marcas se incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos, enzimas, y otros radicales marcadores.

35 Según se utiliza aquí, un “*producto inmunoconjugado*” es una molécula que comprende un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta, o un fragmento de anticuerpo, y una marca detectable. Un producto inmunoconjugado tiene más o menos la misma capacidad, o una capacidad solo ligeramente reducida para unirse a la proteína de unión al TGF-beta después de la conjugación que antes de la conjugación.

40 *Abreviaturas*: TGF-beta - “Factor de Crecimiento Transformante-beta”; TGF-bBP - “Proteína de unión al Factor de Crecimiento Transformante-beta” (una TGF-bBP representativa se denomina “H. Beer”); BMP - “proteína morfogénica del hueso”; PCR - “reacción en cadena de la polimerasa”; RT-PCR - procedimiento de PCR en el cual el ARN es transcrito primero a ADN en la primera etapa utilizando la transcriptasa inversa (RT); ADNc - cualquier ADN elaborado copiando una secuencia de ARN en forma de ADN.

45 Como se ha indicado antes, la presente invención proporciona una clase novedosa de proteínas de unión al TGF-beta, así como medicamentos y composiciones para incrementar el contenido mineral del hueso en animales de sangre caliente. Brevemente, las presentes invenciones se basan en el descubrimiento inesperado de que una mutación en el gen que codifica un miembro novedoso de la familia de las proteínas de unión al TGF-beta produce una rara afección (esclerosteosis) caracterizada por contenidos minerales de los huesos que son una a cuatro veces superiores que en individuos normales. De este modo, como se discute con más detalle más abajo este descubrimiento ha conducido al desarrollo de análisis que pueden ser utilizados para seleccionar moléculas que inhiben la unión de la proteína del unión al TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta y las proteínas morfogénica del hueso (BMP), y de medicamentos que utilizan tales moléculas para incrementar el contenido mineral del hueso de animales de sangre caliente (incluyendo por ejemplo, humanos).

Estudio de la enfermedad conocida como esclerosteosis

55 Esclerosteosis es un término que fue aplicado por Hansen (1967) (Hansen, H.G., Sklerosteose. Opitz, H., Schmid, F., Handbuch der Kinderheilkunde. Berlín: Springer (pub.) 6 1967. págs. 351-355) a un trastorno similar a la hiperostosis cortical generalizada de van Buchem pero posiblemente difiriendo en la apariencia radiológica de los cambios del hueso y en la presencia de sindactilia cutánea asimétrica de los dedos índice y medio en muchos casos.

60 Se sabe ahora que la esclerosteosis es una alteración semi-dominante autosómica que está caracterizada por lesiones escleróticas ampliamente diseminadas del hueso en el adulto. La afección es progresiva. La esclerosteosis también tiene un aspecto evolutivo que está asociado con la sindactilia (dos o más dedos están juntos). El Síndrome de Esclerosteosis está asociado con una gran estatura y muchos individuos afectados alcanzan una altura de uno con ochenta y tres metros (seis pies) o más. El contenido mineral del hueso de los homocigotos puede ser de 1 a 6 veces por encima de los individuos normales y la densidad mineral del hueso puede ser de 1 a 4 veces por encima de los valores normales (v.g., de hermanos no gemelos).

ES 2 272 093 T3

El Síndrome de Esclerosteosis se produce principalmente en Afrikaners de descendencia Alemana en Sudáfrica. Aproximadamente 1/140 individuos de la población Afrikaner son portadores del gen mutado (heterocigotos). La mutación muestra una penetrancia del 100%. Existen informes anecdóticos de aumento de la densidad mineral del hueso en heterocigotos con patologías no asociadas (sindactilia o sobrecrecimiento de la cabeza ósea).

5 En la actualidad parece que no hay anomalía del eje de la pituitaria-hipotálamo en la Esclerosteosis. En particular, no parece haber sobre-producción de la hormona del crecimiento ni de la cortisona. Además, los niveles de hormonas sexuales son normales en los individuos afectados. No obstante, los marcadores de recambio óseo (fosfatasa alcalina específica de osteoblastos, osteocalcina, propéptido C' de procolágeno de tipo I (PICP), y fosfatasa alcalina total, 10 (ver Comier, C., *Curr. Opin. In Rheu.* 7:243, 1995) indican que existe actividad hiperosteoblástica asociada con la enfermedad pero que hay una actividad osteoclástica normal a débilmente disminuida medida mediante marcadores de resorción ósea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido), hidroxiprolina urinaria, fosfatasa ácida resistente al ácido en plasma y galactosilhidroxilisina (ver Coomier, *supra*)).

15 La esclerosteosis se caracteriza por el depósito continuo de hueso a lo largo de todo el esqueleto durante la vida de los individuos afectados. En homocigotos el depósito continuo de mineral del hueso conduce a un sobrecrecimiento del hueso en las áreas del esqueleto en las que hay una ausencia de mecanorreceptores (cabeza ósea, mandíbula, cráneo). En homocigotos con Esclerosteosis, el sobrecrecimiento de los huesos de la cabeza ósea conduce a una compresión craneal y eventualmente a la muerte debido a una presión hidrostática excesiva sobre el tallo encefálico. 20 En todas las demás partes del esqueleto existe una esclerosis generalizada y difusa. Las áreas corticales de los huesos largos están enormemente engrosadas dando como resultado un incremento sustancial en la resistencia del hueso. Las conexiones trabeculares tienen un grosor incrementado que a su vez aumenta la fuerza del hueso trabecular. Los huesos escleróticos aparecen normalmente opacos a los rayos x.

25 Como se describe con más detalle en el Ejemplo 1, la rara mutación genética que es responsable del Síndrome de Esclerosteosis ha sido localizada hacia la región del cromosoma humano 17 que codifica un miembro novedoso de la familia de las proteínas de unión al TGF-beta (un ejemplo representativo del cual es denominado "H. Beer"). Como se describe con más detalle más abajo, basándose en este descubrimiento, el mecanismo de mineralización ósea se comprende más completamente, permitiendo el desarrollo de análisis para moléculas que incrementan la 30 mineralización ósea, y el uso de tales moléculas en la fabricación de medicamentos para incrementar el contenido mineral del hueso, y en el tratamiento o la prevención de un amplio número de enfermedades.

Super-familia del TGF-beta

35 La súper-familia del Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de la secuencia comunes y unidades estructurales (a los niveles tanto secundarios como terciarios). Se sabe que esta familia de proteínas ejerce un amplio espectro de respuestas biológicas sobre una gran variedad de tipos celulares. Muchas de ellas tienen importantes funciones durante el desarrollo embrionario en la formación del patrón y la especificación de tejidos; en adultos, están implicadas, v.g., en la curación de heridas 40 y la reparación ósea y la remodelación ósea, y en la modulación del sistema inmunitario. Además de los tres TGF-beta, en la súper-familia se incluyen las Proteínas Morfogénicas del Hueso (BMP), Activinas, Inhibinas, Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF), y Factores Neurotróficos Derivados de la Glía. La clasificación primaria es establecida por medio de rasgos de la secuencia general que vinculan una proteína específica a una sub-familia general. La estratificación adicional dentro de la sub-familia es posible debido a una conservación de la secuencia más estricta 45 entre los miembros de un grupo más pequeño. En ciertos casos, tales como BMP-5, BMP-6 y BMP-7, esta puede ser tan elevada como el 75 por ciento de homología de aminoácidos entre los miembros del grupo más pequeño. Este nivel de identidad permite que una única secuencia representativa ilustre los elementos bioquímicos clave del sub-grupo que la separa de los otros miembros de la familia más grande.

50 El TGF-beta señala induciendo la formación de complejos hetero-oligoméricos de los receptores tipo I y de tipo II. La estructura cristalina del TGF-beta2 ha sido determinada. El plegado general del monómero de TGF-beta2 contiene una estructura de tipo nudo de cisteína, compacto, estable formado por tres puentes disulfuro. La dimerización, estabilizada por un puente disulfuro, es antiparalela.

55 Los miembros de la familia del TGF-beta inician su acción celular uniéndose a receptores con una actividad serina/treonina quinasa intrínseca. Esta familia de receptores consta de dos subfamilias, denominadas receptores de tipo I y de tipo II. Cada miembro de la familia del TGF-beta se une a una combinación característica de receptores de tipo I y de tipo II, ambos los cuales son necesarios para la señalización. En el modelo actual para la activación del TGF-beta, el TGF-beta se une primero al receptor de tipo II (TbR-II), que aparece en la membrana celular en una forma 60 oligomérica con quinasa activada. Después de eso, el receptor de tipo I (TbR-I), que no puede unirse al ligando en ausencia de TbR-II, es reclutado en el complejo. Después TbR-II fosforila TbR-I predominantemente en un dominio rico en restos glicina y serina (dominio GS) en la región de la yuxtamembrana, y de ese modo activa TbR-I.

Hasta ahora se han identificado siete receptores de tipo I y cinco receptores de tipo II.

65

Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) son proteínas reguladoras claves en la determinación de la densidad mineral del hueso en humanos

Un avance principal en la comprensión de la formación de hueso fue la identificación de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP), también conocidas como proteínas osteogénicas (OP), que regulan la diferenciación del cartílago y el hueso *in vivo*. Las BMP/OP inducen la diferenciación del hueso endocondral por medio de una cascada de eventos que incluyen la formación de cartílago, la hipertrofia y la calcificación del cartílago, la invasión vascular, la diferenciación de osteoblastos, y la formación de hueso. Como se ha descrito antes, las BMP/OP (BMP 2-14, y proteínas osteogénicas 1 y 2, OP-1 y OP-2) son miembros de la súper-familia del TGF-beta. La sorprendente conservación evolutiva entre los miembros de la sub-familia de BMP/OP sugiere que son críticos en el desarrollo y la función normal de los animales. Por otra parte, la presencia de múltiples formas de BMP/OP plantea una cuestión importante acerca de la relevancia biológica de esta aparente redundancia. Además de la condrogénesis y la osteogénesis post-fetal, las BMP/OP juegan múltiples papeles en la esquelotogénesis (incluyendo el desarrollo de los tejidos craneofaciales y dentales) y en el desarrollo embrionario y a organogénesis de los órganos parenquimatosos, incluyendo el riñón. Se sabe ahora que la naturaleza cuenta con mecanismos moleculares comunes (y escasos) adaptados para proporcionar la emergencia de tejidos y órganos especializados. La súper-familia de BMP/OP es un elegante ejemplo de parsimonia natural en la programación de múltiples funciones especializadas que despliegan isoformas moleculares con una variación minoritaria en las unidades de aminoácidos dentro de regiones carboxi terminales altamente conservadas.

Antagonismo de BMP

Las sub-familias de las BMP y la Activina están sujetas a una regulación post-traducciona significativa. Existe un sistema de control extracelular intrincado, por medio del cual se sintetiza y se exporta un antagonista de elevada afinidad, y con posterioridad forma complejos selectivamente con las BMP o las activinas para desorganizar su actividad biológica (W.C. Smith (1999) *TIG 15*(1) 3-6). Han sido identificados algunos de estos antagonistas naturales, y basándose en la divergencia de la secuencia parecen haber evolucionado independientemente debido a la carencia de conservación de la secuencia primaria. No ha habido un trabajo estructural hasta la fecha sobre esta clase de proteínas. Los estudios de estos antagonistas han destacado una clara diferencia para interaccionar y neutralizar BMP-2 y BMP-4. Además, el mecanismo de inhibición parece diferir para los diferentes antagonistas (S. Iemura y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 9337-9342).

Proteínas de unión a TGF-beta novedosas

1. Antecedente re: proteínas de unión al TGF-beta

Como se ha observado antes, la presente invención proporciona un clase novedosa de proteínas de unión al TGF-beta que posee un armazón de cisteína (disulfuro) casi idéntico cuando se comparaba con DAN Humana, Gremlin Humana, y Cerberus Humana, y SCGF (Patente de los estados Unidos Núm. 5.780.263) pero no posee casi homología a nivel de nucleótidos (para la información antecedente, ver generalmente Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., Harland, R.M., "The Xenopus Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities", *Molecular Cell* 1:673-683, 1998).

Un ejemplo representativo de la clase novedosa de proteínas de unión al TGF-beta se describe en las Secuencias de ID Núms. 1, 5, 9, 11, 13, y 15. Se debe entender que los miembros representativos de esta clase de proteínas de unión incluyen variantes de la proteína de unión al TGF-beta (v.g., las Secuencias de ID Núms. 5 y 7). Según se utiliza aquí, un "gen variante de la proteína de unión al TGF-beta" hace referencia a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de las Secuencias de ID Núms. 2, 10, 12, 14 o 16. Entre tales variantes se incluyen los polimorfismos de origen natural o las variantes alélicas de los genes de la proteína de unión al TGF-beta, así como genes sintéticos que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas de estas secuencias de aminoácidos. Las formas variantes adicionales de un gen de la proteína de unión al TGF-beta son moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o deleciones de las secuencias de nucleótidos descritas aquí. Los genes variantes de la proteína de unión al TGF-beta pueden ser identificados determinando si los genes hibridan con una molécula de ácido nucleico que tenga la secuencia de nucleótidos de las Secuencias de ID Núms. 1, 5, 7, 9, 11, 13, o 15 en condiciones restrictivas. Además, los genes variantes de la proteína de unión al TGF-beta deben codificar una proteína que tenga un esqueleto de cisteína.

Como alternativa, se pueden identificar genes variantes de la proteína de unión al TGF-beta mediante comparación de la secuencia. Según se utiliza aquí, dos secuencias de aminoácidos tienen una "identidad de secuencia del 100%" si los restos aminoácido de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia. De un modo similar, dos secuencias de nucleótidos tienen una "identidad de secuencia del 100%" si los restos nucleotídicos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia. Las comparaciones de la secuencia se pueden realizar utilizando programas de soporte lógico normalizados tales como los incluidos en la Suite de computación bioinformática LASERGENE, que es producida por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros métodos para comparar dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos mediante la determinación del alineamiento óptimo son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Peruski y Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press. Inc. 1997), Wu y col. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins", en *Methods in*

ES 2 272 093 T3

Gene Biotechnology, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), y Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2ª Edición (Academic Press, Inc. 1998)).

Una proteína de unión al TGF-beta variante debe tener al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 50% con las Secuencias de ID Núms. 2, 6, 10, 12, 14, o 16 y preferiblemente, una identidad de más del 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, o 95%. Alternativamente, las variantes de la proteína de unión al TGF-beta pueden ser identificadas por tener una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 70% con las Secuencias de ID Núms. 1, 5, 9, 11, 13 o 15. Por otra parte, la presente invención contempla las variantes del gen de la proteína de unión al TGF-beta que tienen una identidad de más del 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% con el SEQ ID NO. 1. Sin hacer caso del método concreto utilizado para identificar un gen variante de una proteína de unión al TGF-beta o una proteína de unión al TGF-beta, una proteína de unión al TGF-beta variante o un polipéptido codificado por un gen de la proteína de unión al TGF-beta variante puede ser caracterizado funcionalmente, por ejemplo, mediante su capacidad para unirse a y/o inhibir la señalización de un miembro seleccionado de la familia de proteínas del TGF-beta, o mediante su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo de una proteína de unión al TGF-beta.

En la presente invención se incluyen fragmentos funcionales de los genes de las proteínas de unión al TGF-beta. En el contexto de esta invención, un "fragmento funcional" de un gen de una proteína de unión al TGF-beta hace referencia a una molécula de ácido nucleico que codifica una porción de un polipéptido de la proteína de unión al TGF-beta que o bien posee (1) la actividad funcional indicada antes, o bien (2) se une específicamente con un anticuerpo de una proteína de unión al TGF-beta. Por ejemplo, un fragmento funcional de un gen de una proteína de unión al TGF-beta descrito aquí comprende una porción de la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Núms: 1, 5, 9, 11, 13, o 15.

2. Aislamiento del gen de la proteína de unión al TGF-beta

Se pueden obtener moléculas de ADN que codifican un gen de una proteína de unión rastreando una genoteca deADNc o genómico humano utilizando sondas polinucleotídicas basadas, por ejemplo, en la SEC ID NO: 1.

Por ejemplo, la primera etapa en la preparación de una genoteca deADNc es aislar el ARN utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En general, las técnicas de aislamiento de ARN deben proporcionar un método para romper las células, un medio para inhibir la degradación de ARN dirigida por la ARNasa, y un método para separar el ARN del ADN, la proteína y los polisacáridos contaminantes. Por ejemplo, se puede aislar el ARN total congelando el tejido en nitrógeno líquido, triturando el tejido congelado con un mortero y una mano de mortero para lisar las células, extrayendo el tejido triturado con una solución de fenol/cloroformo para separar las proteínas, y separando el ARN de las impurezas restantes mediante precipitación selectiva con cloruro de litio (ver, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edición, páginas 4-1 a 4-6 (John Wiley & Sons 1995) ["Ausubel (1995)"]; Wu y col., *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 33-41] (CRC Press, Inc. 1997) ["Wu (1997)"].

Alternativamente, el ARN total puede ser aislado extrayendo el tejido triturado con isotiocianato de guanidinio, extrayendo con disolventes orgánicos, y separando el ARN de los contaminantes utilizando la centrifugación diferencial (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 4-1 a 4-6; Wu (1997) en las páginas 33-41).

Con el fin de construir una genoteca deADNc, se debe aislar ARN poli(A)⁺ de la preparación de ARN total. El ARN poli(A)⁺ puede ser aislado del ARN total utilizando la técnica normalizada de la cromatografía en oligo(dT)-celulosa (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 4-11 a 4-12).

Las moléculas de ADNc de doble hebra son sintetizadas a partir de ARN poli(A)⁺ utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Wu (1997) en las páginas 41-46). Por otra parte, se pueden utilizar estuches asequibles comercialmente para sintetizar moléculas de ADNc de doble hebra. Por ejemplo, tales estuches son asequibles de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, California), Promega Corporation (Madison, Wisconsin) y Stratagene Cloning Systems (La Jolla, California).

El enfoque básico para obtener clones de ADNc de la proteína de unión al TGF-beta puede ser modificado construyendo una genoteca deADNc sustraída que esté enriquecido en moléculas de ADNc específicas de la proteína de unión al TGF. Los mecanismos para construir genotecas sustraídas son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sargent, "Isolation of Differentially Expressed Genes" en *Meth. Enzymol.* 152:423, 1987, y Wu y col., (eds.) "Construction and Screening of Subtracted and Complete Expression cDNA Libraries", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 29-65 (CRC Press, Inc. 1997)).

Diversos vectores de clonación son apropiados para la construcción de una genoteca deADNc. Por ejemplo, se puede preparar una genoteca deADNc en un vector derivado de bacteriófagos, tal como un vector λ gt10 (ver, por ejemplo, Huynh y col., "Construction and Screening cDNA in λ gt10 and λ gt11", en *DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I*, Glover (ed.) página 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) en las páginas 47-52).

Alternativamente, se pueden insertar moléculas de ADNc de doble hebra en un vector plasmídico, tal como un vector pBluescript (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, California), LambdaGEM-4 (Promega Corp.; Madison, Wisconsin) u otros vectores asequibles comercialmente. Los vectores de clonación adecuados también pueden ser obtenidos de la American Type Culture Collection (Rockville, Maryland).

ES 2 272 093 T3

Con el fin de amplificar las moléculas de ADNc clonadas, la genoteca deADNc es insertada en un huésped procarionótico, utilizando mecanismos normalizados. Por ejemplo, se puede introducir una genoteca deADNc en células *E. coli* DH5 competentes, que pueden ser obtenidas de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland).

Se puede preparar una genoteca de ADN genómico humano por métodos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327). Se puede aislar ADN genómico lisando tejido con el detergente Sarkosyl, digiriendo el producto lisado con proteinasa K, aclarando los restos insolubles del producto lisado mediante centrifugación, precipitando el ácido nucleico del producto lisado utilizando isopropanol, y purificando el ADN resuspendido en un gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Los fragmentos de ADN que son adecuados para la producción de una genoteca genómica pueden ser obtenidos sometiendo a cizalla al azar el ADN genómico o mediante digestión parcial del ADN genómico con endonucleasas de restricción. Los fragmentos de ADN genómico pueden ser insertados en un vector, tal como un vector bacteriófago o cosmídico, según los mecanismos convencionales, tal como el uso de la digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, el uso del tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada de moléculas de ADN, y la ligadura con ligasa apropiadas. Los mecanismos para semejante manipulación son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un gen de la proteína de unión al TGF-beta también pueden ser obtenidas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores oligonucleotídicos que tengan secuencias de nucleótidos del gen de la proteína de unión al TGF-beta humano, como se describe aquí. Los métodos generales para rastrear genotecas con PCR son proporcionados por ejemplo, por Yu y col., "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.) páginas 211-215 (Humana Press, Inc. 1993). Por otra parte, describen mecanismos para utilizar la PCR para aislar genes relacionados, por ejemplo, Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members", in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 317-337 (Humana Press, Inc. 1993).

Alternativamente, se pueden obtener genotecas genómicas humanas de fuentes comerciales tales como Research Genetics (Huntsville, AL) y American Type Culture Collection (Rockville, Maryland).

Se puede rastrear una genoteca que contiene ADNc o clones genómicos con una o más sondas polinucleotídicas basadas en el SEC ID NÚM: 1, utilizando métodos normalizados (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-1 a 6-11).

Los anticuerpos anti-proteína de unión al TGF-beta, producidos como se describe más abajo, también pueden ser utilizados para aislar secuencias de ADN que codifican los genes de la proteína de unión al TGF-beta de las genotecas de ADNc. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser utilizados para rastrear genotecas de expresión de λ gt11, o se pueden utilizar los anticuerpos para el inmunorastreo después de la selección y la traducción de híbridos (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-12 a 6-16; Margolis y col., "Screening λ expression libraries with antibody and protein probes", en *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición*, Glover y col., (eds.) páginas 1-14 (Oxford University Press 1995)).

La secuencia de un ADNc de una proteína de unión al TGF-beta o de un fragmento genómico de la proteína de unión al TGF-beta puede ser determinada utilizando métodos normalizados. Por otra parte, la identificación de fragmentos genómicos que contienen un promotor o un elemento regulador de la proteína de unión al TGF-beta puede ser lograda utilizando mecanismos bien establecidos, tales como análisis de delección (ver, generalmente, Ausubel (1995)).

Como alternativa, se puede obtener un gen de una proteína de unión al TGF-beta sintetizando moléculas de ADN utilizando oligonucleótidos largos mutuamente cebadores y secuencias de nucleótidos descritas aquí (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Los mecanismos establecidos que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de al menos dos kilobases de longitud (Adang y col., *Plant Molec. Biol.* 21:1131, 1993; Bambot y col., *PCR Methods and Applications* 2:266, 1993; Dilton y col., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc., 1993); Holowachuk y col., *PCR Methods Appl.* 4:299, 1995).

3. Producción de genes de la proteína de unión al TGF-beta

Se pueden obtener moléculas de ácido nucleico que codifican genes de proteína de unión a TGF-beta variantes rastreando diversas genotecas de ADNc o genómico con sondas oligonucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos basadas en los SEC ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15, utilizando los procedimientos descritos antes. Las variantes del gen de la proteína de unión al TGF-beta también pueden ser construidas sintéticamente. Por ejemplo, se puede idear una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga un cambio de aminoácido conservativo, en comparación con la secuencia de aminoácidos de los SEC ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, o 16. Esto es, se pueden

obtener variantes que contengan una o más sustituciones de aminoácidos de los SEC ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16, en las cuales un aminoácido alifático está sustituido por un aminoácido alifático en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al TGF-beta, un aminoácido aromático está sustituido por un aminoácido aromático en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al TGF-beta, un aminoácido que contiene azufre es sustituido por un aminoácido que contiene azufre en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al TGF-beta, un aminoácido que contiene hidroxilo es sustituido por un aminoácido que contiene azufre en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al TGF-beta, un aminoácido ácido es sustituido por un aminoácido ácido en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al TGF-beta, un aminoácido alcalino es sustituido por un aminoácido alcalino en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al TGF-beta, o un aminoácido monocarboxílico dibásico es sustituido por un aminoácido monocarboxílico dibásico en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al TGF-beta.

Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, una “sustitución de aminoácidos conservativa” es ilustrada por una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina, y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparragina, y (6) lisina, arginina e histidina. Al realizar tales sustituciones, es importante, cuando sea posible mantener el esqueleto de cisteína esbozado en la Figura 1.

Los cambios de aminoácidos conservativos en el gen de la proteína de unión al TGF-beta pueden ser introducidos sustituyendo nucleótidos por los nucleótidos citados en el SEC ID NO: 1. Tales “variantes de aminoácido conservativo” pueden ser obtenidas, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, y similar (ver Ausubel (1995) en las páginas 8-10 a 8-22, y McPherson (ed.), *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (IRL Press 1991)). La capacidad funcional de tales variantes puede ser determinada utilizando un método normalizado, tal como el análisis descrito aquí. Alternativamente, un polipéptido de la proteína de unión al TGF-beta variante puede ser identificado mediante la capacidad de unirse específicamente a anticuerpos anti-proteína de unión al TGF-beta.

Se pueden realizar análisis de delección rutinarios de moléculas de ácido nucleico para obtener “fragmentos funcionales” de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la proteína de unión al TGF-beta. Como ilustración, se pueden digerir moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 1 con la nucleasa Bal31 para obtener una serie de delecciones encajadas. Después los fragmentos son insertados en vectores de expresión en un marco de lectura apropiado, y los polipéptidos expresados son aislados y sometidos a ensayo en cuanto a su actividad, o en cuanto a la capacidad de unirse a anticuerpos anti-proteína de unión al TGF-beta. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es la utilización de la mutagénesis dirigida al oligonucleótido para introducir delecciones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento deseado. Alternativamente, se pueden sintetizar fragmentos concretos de un gen de la proteína de unión al TGF-beta utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los mecanismos normalizados para el análisis funcional de las proteínas son descritos, por ejemplo, por Treuter y col., *Molec. Gen. Genet.* 240:113, 1993; Content y col., “Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon”, en *Biological Interferon Systems*, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, “The EGF Receptor”, en *Control of Animal Cell Proliferation, Vol. I*, Boynton y col., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985); Coumilleau y col., *J. Biol. Chem.* 270:29270, 1995; Fukunaga y col., *J. Biol. Chem.* 270:25291, 1995; Yamaguchi y col., *Biochem. Pharmacol.* 50:1295, 1995; y Meisel y col., *Plant Molec. Biol.* 30:1, 1996.

La presente invención también contempla fragmentos funcionales de un gen de la proteína de unión al TGF-beta que tienen cambios de aminoácidos conservativos.

Un gen variante de la proteína de unión al TGF-beta puede ser identificado basándose en la estructura determinando el nivel de identidad con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los SEC ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15 y 2, 6, 10, 12, 14, o 16, como se ha discutido antes. Un enfoque alternativo para identificar un gen variante basándose en la estructura consiste en determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un gen de la proteína de unión al TGF-beta variantes puede hibridar en condiciones restrictivas con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de los SEC ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15, o una porción de la misma de una longitud de al menos 15 o 20 nucleótidos. Como ilustración de las condiciones de hibridación restrictivas, se puede unir una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia de la proteína de unión al TGF-beta variante con un fragmento de una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia de la SEC ID NO: 1 en un tampón que contenga, por ejemplo, 5xSSPE (1xSSPE = cloruro de sodio 180 mM, fosfato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,7), 5x solución de Denhardt (100xDenhardt = seralbúmina bovina al 2% (p/v), Ficoll al 2% (p/v), polivinilpirrolidona al 2% (p/v) y SDS al 0,5% incubado durante la noche a 55-60°C. Los lavados post-hibridación con una alta restricción se realizan típicamente en 0,5xSSC (1xSSC = cloruro de sodio 150 mM, citrato de sodio 15 mM) o en 0,5xSSPE a 55-60°C.

Con independencia de la secuencia de nucleótidos concreta de un gen de la proteína de unión al TGF-beta variante, el gen codifica un polipéptido que puede ser caracterizado por su actividad funcional, o por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-proteína de unión al TGF-beta. Más específicamente, los genes de la proteína de unión al TGF-beta variantes codifican polipéptidos que muestran al menos un 50%, y preferiblemente, más del 60, 70, 80 o 90% de la actividad de los polipéptidos codificados por el gen de la proteína de unión al TGF-beta humano descrito aquí.

4. Producción de la proteína de unión al TGF-beta en Células Cultivadas

Para expresar un gen de una proteína de unión al TGF-beta, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido debe ser conectada operablemente a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión y después introducida en una célula huésped. Además de las secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores e intensificadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencia reguladoras de la traducción y un gen marcador que sea adecuado para la selección de células que portan el vector de expresión.

Los vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína foránea en células eucarióticas contienen típicamente (1) elementos de ADN procariótico que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibióticos para proporcionar el crecimiento y la selección del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN eucariótico que controlan el inicio de la transcripción, tal como un promotor, y (3) elementos de ADN que controlan la maduración de los transcritos, tales como una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación.

Las proteínas de unión al TGF-beta de la presente invención son expresadas preferiblemente en células de mamífero. Entre los ejemplos de las células huésped de mamífero se incluyen células de riñón de mono verde Africano (Vero; ATCC CRL 1587, células de riñón embrionario humano ((293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de cría de hámster (BHK-21; ATCC CRL 8544), células de riñón caninas (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster Chino (CHO-K1; ATCC CCL61), células de pituitaria de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias de ratón (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

Para un huésped mamífero, las señales reguladoras de la transcripción y la traducción pueden derivar de fuentes virales, tales como adenovirus, virus de papiloma bovino, virus de simios, o similar, en los cuales las señales reguladoras están asociadas con un gen concreto que tiene un elevado nivel de expresión. Las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales también pueden ser obtenidas de genes de mamíferos, tales como los genes de actina, colágeno, miosina, y metalotioneína.

Entre las secuencias reguladoras transcripcionales se incluyen una región promotora suficiente para dirigir el inicio de la síntesis de ARN. Entre los promotores eucarióticos adecuados se incluyen el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón [Hamer y col., *J. Molec. Appl. Genet.* 1:273,1982], el promotor TK del Herpes virus [McKnight, *Cell* 31:355, 1982], el promotor temprano de SV40 [Benoist y col., *Nature* 290:304,1981], el promotor del virus del Sarcoma de Rous [Gorman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9:6777, 1982], el promotor de citomegalovirus [Foecking y col., *Gene* 45, 101, 1980], y el promotor del virus del tumor mamario de ratón (ver, generalmente, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en *Protein Engineering Principles and Practice*, Cleland y col. (eds.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Alternativamente, se puede utilizar un promotor procariótico, tal como el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T3 para controlar la expresión del gen de la proteína de unión al TGF-beta en células de mamífero si el promotor procariótico está regulado por un promotor eucariótico (Zhou y col., *Mol. Cell. Biol.* 10:4529, 1990; Kaufman y col., *Nucl. Acids Res.* 19:4485, 1991).

Los genes de la proteína de unión al TGF-beta también pueden ser expresados en células bacterianas, de levadura, de insectos o de plantas. Los promotores adecuados que pueden ser utilizados para expresar los polipéptidos de la proteína de unión al TGF-beta en un huésped procariótico son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen promotores capaces de reconocer las polimerasas de T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P_R y P_I del bacteriófago lambda, los promotores trp, recA, del choque térmico, lacUV5, tac, lpp-lacSpr, phoA, y lacZ de *E. coli*, los promotores de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, los promotores de *Streptomyces*, el promotor int del bacteriófago lambda, el promotor bla de pBR322, y el promotor CAT del gen de la cloramfenicol acetil transferasa. Los promotores procarióticos han sido revisados por Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277, 1987, Watson y col., *Molecular Biology of the Gene*, 4^a Ed. (Benjamin Cummins 1987), y por Ausubel y col., (1995).

Entre los huéspedes procarióticos preferidos se incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Entre las cepas adecuadas de *E. coli* se incluyen BL21(DE3), BL2(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4, DH5, DH51, DH51F', DH51MCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38,RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, y ER1647 (ver, por ejemplo, Brown (Ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Entre las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* se incluyen BR151, YB886, M1119, M1120, y B170 (ver, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods", en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (Ed.) (IRL Press 1985)).

Los métodos para expresar proteínas en huéspedes procarióticos son bien conocidos para los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Williams y col., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2^a Edición, Glover y col. (eds.) página 15 (Oxford University Press 1995), Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995); y Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y col., (eds.), página 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

El sistema de baculovirus proporciona un medio eficaz de introducir genes de la proteína de unión al TGF-beta clonada en células de insecto. Los vectores de expresión adecuados están basados en el virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), y contienen promotores bien conocidos tales como el promotor 70 de la proteína del choque térmico de *Drosophila* (hsp), el promotor del gen temprano inmediato (ie-1) y el promotor 39K temprano retardado de *Autographa californica*, el promotor p10 de baculovirus, y el promotor de la metalotioneína de *Drosophila*. Entre las células huésped e insecto adecuadas se incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-Sf-21, una línea celular de ovario de pulpa de *Spodoptera frugiperda*, tal como Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE, y Sf21 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), así como células Schneider-2 de *Drosophila*. Las técnicas establecidas para producir proteínas recombinantes en sistemas de baculovirus son proporcionadas por Bailey y col., "Manipulation of Baculovirus Vectors", en *Methods in Molecular Biology, Volumen 7: Gene Transfer and Expression Protocols*, Murray (ed.), páginas 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), por Patel y col., "The baculovirus expression system", en *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición*, Glover y col. (eds.), páginas 205-244 (Oxford University Press 1995), por Ausubel (1995) en las páginas 16-37 a 16-57, por Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995), y por Lucknow, "Insect Cell Expression Technology", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y col. (eds.), páginas 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

Entre los promotores para la expresión en levaduras se incluyen promotores de *GALI* (galactosa), *PGK* (fosfoglicerato quinasa), *ADH* (alcohol deshidrogenasa), *AOXI* (alcohol oxidasa), *HIS4* (histidinol deshidrogenasa), y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación de levaduras y son asequibles fácilmente. Entre estos vectores se incluyen vectores basados en YIp, tales como YIp5, vectores YRp, tales como YRp17, vectores YEp tales como YEp13 y vectores YCp, tales como YCp19. Un experto en la técnica apreciará que hay una amplia variedad de vectores adecuados para la expresión en células de levadura.

Los vectores de expresión también pueden ser introducidos en protoplastos de plantas, tejidos vegetales intactos, o células vegetales aisladas. Los métodos generales para cultivar tejidos vegetales son proporcionados, por ejemplo, por Miki y col., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants", en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick y col. (eds.), páginas 67-88 (CRC Press, 1993).

Un vector de expresión puede ser introducido en células huésped utilizando una variedad de mecanismos normalizados incluyendo la transfección con fosfato de calcio, la transfección mediada por liposomas, el reparto mediado por microproyectiles, la electroporación, y similares. Preferiblemente, las células transfectadas son seleccionadas y propagadas para proporcionar células huésped recombinantes que comprendan el vector de expresión integrado establemente en el genoma de la célula huésped. Las técnicas para introducir vectores en células eucarióticas y las técnicas para seleccionar tales transformantes estables utilizando un marcador seleccionable dominante son descritas, por ejemplo, por Ausubel (1995) y por Murray (ed.), *Gene Transfer and Expression Protocols* (Humana Press 1991). Los métodos para introducir vectores de expresión en células bacterianas, de levadura, de insectos, y vegetales también son proporcionados por Ausubel (1995).

Los métodos generales para expresar y recuperar la proteína foránea producida por un sistema celular de mamífero son proporcionados por ejemplo, por Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y col. (eds.), páginas 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Los mecanismos normalizados para recuperar la proteína producida por un sistema bacteriano son proporcionados, por ejemplo, por Grisshammer y col., "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells", en *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición*, Glover y col. (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995). Los métodos establecidos para el aislamiento de proteínas recombinante a partir de un sistema de baculovirus son descritos por Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc., 1995).

Más generalmente, la proteína de unión al TGF-beta puede ser aislada mediante mecanismos normalizados, tales como la cromatografía de afinidad, la cromatografía de exclusión por tamaños, la cromatografía de intercambio iónico, la HPLC y similares. Se pueden idear variaciones adicionales en el aislamiento y la purificación de la proteína de unión al TGF-beta por parte de aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta, obtenidos como se describe más abajo, para aislar grandes cantidades de proteína mediante purificación por inmunofinidad.

5. Producción de Anticuerpos para las proteína de unión al TGF-beta

Los anticuerpos para la proteína de unión al TGF-beta pueden ser obtenidos, por ejemplo, utilizando el producto de una expresión como antígeno. Los anticuerpos anti-proteína de unión al TGF-beta particularmente útiles se "unen específicamente" con la proteína de unión al TGF-beta de los SEC ID Núms. 2, 6, 10, 12, 14, o 16, pero no a otras proteínas de unión al TGF-beta tales como Dan, Cerberus, SCGF, o Gremlin. Los anticuerpos de la presente invención (incluyendo los fragmentos y derivados de los mismos) pueden ser un anticuerpo policlonal o, especialmente, uno monoclonal. El anticuerpo puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina, y puede ser por ejemplo un anticuerpo IgG, por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgE, IgM, o IgA. Puede ser de origen animal, por ejemplo de mamífero, y puede ser por ejemplo un anticuerpo de ratón, de rata, humano o de otro primate. Cuando se desea el anticuerpo puede ser un anticuerpo internalizante.

Los anticuerpos policlonales para la proteína de unión al TGF-beta recombinante pueden ser preparados utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Green y col. "Production of Polyclonal Anti-

sera”, en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press 1992); Williams y col., “Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies”, en *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición*, Glover y col. (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995)). Aunque los anticuerpos policlonales se originan típicamente en animales tales como ratas, ratones, conejos, cabras, u ovejas, un anticuerpo anti-proteína de unión al TGF de la presente invención también puede derivar de un anticuerpo de primate sub-humano. Los mecanismos generales para originar anticuerpos útiles para el diagnóstico y la terapia en babuinos fueron encontrados, por ejemplo, en Goldenberg y col., publicación de patente internacional Núm. WO 91/11465 (1991), y en Losman y col., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990.

El anticuerpo debe comprender al menos un dominio de la región variable. El dominio de la región variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una secuencia de aminoácidos hipervariable responsable de la unión al antígeno embebido en una secuencia marco. En términos generales el dominio de la región variable (V) puede ser cualquier ordenación adecuada de dominios variables de la cadena pesada (V_H) y/o ligera (V_L) de inmunoglobulina. De este modo por ejemplo el dominio de la región V puede ser monomérico y ser un dominio V_H o V_L donde estos sean capaces de unirse independientemente con una afinidad aceptable. Alternativamente el dominio de la región V puede ser dímérico y contener dímeros V_H - V_H , V_H - V_L , o V_L - V_L en los cuales las cadenas V_H y V_L están asociadas no covalentemente (abreviado en adelante como F_V). Cuando se desea, no obstante, las cadenas pueden estar acopladas covalentemente o bien directamente, por ejemplo por medio de un enlace disulfuro entre los dos dominios variables, o a través de un ligador, por ejemplo un ligador peptídico, para formar un dominio de cadena sencilla (abreviado en adelante como scF_V).

El dominio de la región variable puede ser cualquier dominio variable de origen natural o una versión diseñada del mismo. Por versión diseñada se quiere significar un dominio de la región variable que ha sido creado utilizando mecanismos de diseño de ADN recombinante. Entre tales versiones diseñadas se incluyen aquellas creadas por ejemplo a partir de regiones variables de anticuerpos naturales mediante inserciones, deleciones o cambios en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Entre los ejemplos concretos de este tipo se incluyen aquellos dominios de la región variable diseñados que contienen al menos una CDR y opcionalmente uno o más aminoácidos marco de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo.

El dominio de la región variable puede estar anclado covalentemente en un aminoácido C-terminal a al menos otro dominio del anticuerpo o un fragmento del mismo. De este modo, por ejemplo cuando un dominio V_H está presente en el dominio de la región variable este puede estar conectado a un dominio C_{H1} de la inmunoglobulina o un fragmento del mismo. De un modo similar un dominio V_L puede estar conectado a un dominio C_K o un fragmento del mismo. De este modo por ejemplo el anticuerpo puede ser un fragmento Fab en el que el dominio de unión al antígeno contiene dominios V_H y V_L asociados conectados en sus extremos C a un dominio $CH1$ y C_K respectivamente. El dominio $CH1$ puede ser prolongado con aminoácidos adicionales, por ejemplo para proporcionar un dominio de la región bisagra como el encontrado en un fragmento Fab', o para proporcionar dominios adicionales, tales como los dominios $CH2$ y $CH3$ del anticuerpo.

Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos CDR (“unidades mínimas de reconocimiento”) pueden ser obtenidos construyendo genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes son preparados, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpos (ver, por ejemplo, Larrick y col., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies”, en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter y col. (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995); y Ward y col., “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies”, en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch y col., (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden ser en general monoclonales (preparados mediante inmunización convencional y procedimientos de fusión celular) o en el caso de los fragmentos, derivados de allí utilizando cualquier mecanismo químico normalizado adecuado v.g., reducción o escisión enzimática y/o digestión, por ejemplo mediante tratamiento con pepsina.

Más específicamente, los anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta monoclonales pueden ser generados utilizando una variedad de técnicas. Los anticuerpos monoclonales de roedor para antígenos específicos pueden ser obtenidos mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Kohler y col., *Nature* 256:495, 1975; y Coligan y col. (eds.) *Current Protocols in Immunology*, 1:2.5-1.2.7 (John Wiley & Sons 1991) [“Coligan”], Picklesley y col., “Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*”, en *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición*, Glover y col., (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)).

En resumen, se pueden obtener anticuerpos monoclonales inyectando en ratones una composición que comprende un producto génico de la proteína de unión a TGF-beta, verificando la presencia de producción de anticuerpo mediante la separación de una muestra de suero, separación del bazo para obtener B-linfocitos, fusión de los B-linfocitos con células de mieloma para producir hibridomas, clonación de los hibridomas, selección de clones positivos que producen anticuerpos para el antígeno, cultivo de los clones que producen los anticuerpos para el antígeno, y aislamiento de los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

Además, un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta de la presente invención puede derivar de un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos son obtenidos a partir de ratones transgénicos que han sido diseñados para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una sensibilización antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus de la cadena pesada y ligera humana en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen desorganizaciones redireccionadas de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden ser utilizados para producir hibridomas de rastreo de anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, Green y col., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg y col., *Nature* 368:856, 1994; y Taylor y col., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser aislados y purificados a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de mecanismos bien establecidos. Entre tales mecanismos de aislamiento se incluyen la cromatografía de afinidad con Proteína A-Sepharose, la cromatografía de exclusión por tamaños, y la cromatografía de intercambio iónico (ver, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3; Baines y col., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, páginas 79-104 (The Human Press, Inc. 1992)).

Para usos concretos, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta. Tales fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos, por ejemplo, mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos mediante digestión con pepsina o papaína de los anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Como ilustración, se pueden producir fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede ser escindido adicionalmente utilizando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. Opcionalmente, la reacción de escisión puede ser realizada utilizando un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática en la que se utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos son descritos por ejemplo, por Goldenberg, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.331.647, Nisonoff y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960, Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959, Edelman y col., en *Methods in Enzymology* 1:422 (Academic Press 1967), y por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10-2.10.4.

También se pueden utilizar otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera monovalentes, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, con tal que los fragmentos se unan al antígeno que sea reconocido por el anticuerpo intacto.

Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante o diseñado genéticamente obtenido mediante el uso de mecanismos de ADN recombinante que implican la manipulación y la re-expresión del ADN que codifica las regiones variable y/o constante del anticuerpo. Semejante ADN es conocido y/o es fácilmente asequible de genotecas de ADN incluyendo por ejemplo genotecas de anticuerpos de fagos (ver Chiswell, D.J. y McCafferty, J. *Tibtech.* 10 80-84 (1992)) o se puede sintetizar cuando se desee. Los procedimientos de la biología molecular y/o la química normalizados pueden ser utilizados para secuenciar y manipular el ADN, por ejemplo, para introducir codones para crear restos de cisteína, para modificar, añadir o suprimir otros aminoácidos o dominios según se desee.

A partir de aquí, uno o más vectores de expresión replicables que contengan el ADN y pueden ser preparados y utilizados para transformar una línea celular apropiada, v.g. una línea celular de mieloma no productora, tal como una línea NSO de ratón o una línea bacteriana, v.g. de *E. coli*, en la cual tendrá lugar la producción del anticuerpo. Con el fin de obtener una transcripción y una traducción eficaz, una secuencia de ADN de cada vector debe incluir secuencias reguladoras apropiadas, concretamente un promotor y una secuencia líder conectada operablemente a la secuencia de dominio variable. Los métodos concretos para producir anticuerpos de esta manera son generalmente bien conocidos y utilizados rutinariamente. Por ejemplo, describen procedimientos de la biología molecular básicos Maniatis y col. (*Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989); la secuenciación del ADN se puede realizar como describen Sanger y col. (*PNAS* 74, 5463, (1977)) y el manual de secuenciación plc de Amersham International; y la mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo según el método de Kramer y col. (*Nucl. Acids Res.* 12, 9441, (1984)) y el manual *Anglian Biotechnology Ltd.* Adicionalmente, existen numerosas publicaciones, que detallan técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos mediante la manipulación del ADN, la creación de vectores de expresión y la transformación de células apropiadas, por ejemplo como revisan Mountain A y Adair, J R in *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (ed. Tombs, M P, 10, Capítulo 1, 1992, Intercept, Andover, UK) y en la Memoria de la Patente Internacional Núm. WO 91/09967.

Cuando se desea, el anticuerpo según la invención puede tener una o más moléculas efectoras o informadoras ancladas a él y la invención se amplía a tales proteínas modificadas. Las moléculas efectoras o informadoras pueden estar ancladas al anticuerpo a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible, aminoácido amino terminal o, cuando esté presente un grupo funcional carbohidrato localizado en el anticuerpo, siempre que, por supuesto, este no afecte adversamente a las propiedades de unión y a la utilidad eventual de la molécula. Entre los grupos funcionales concretos se incluyen, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo, carboxilo o aldehído libre. El anclaje del anticuerpo y la molécula o las moléculas efectoras y/o informadoras puede ser logrado vía tales grupos y un grupo funcional apropiado en las moléculas efectoras o informadoras. La conexión puede ser directa o indirecta, por medio de grupo espaciadores o formadores de puentes.

Entre las moléculas efectoras se incluyen, por ejemplo, agentes antineoplásicos, toxinas (tales como toxinas farmacéuticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de las mismas v.g. ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, v.g., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, polímeros de origen natural y sintético v.g. polisacáridos y polímeros de polialquileno tales como poli(etilenglicol) y derivados del mismo, radionúclidos, concretamente radioyoduro, y metales quelantes. Entre los grupos informadores adecuados se incluyen metales quelados, compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Entre los agentes antineoplásicos concretos se incluyen agentes citotóxicos y cistostáticos, por ejemplo, agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (v.g., clorambucil, melfalan, mecloretamina, ciclofosfamida, o mostaza de uracilo) y los derivados de los mismos, trietilenfosforamida, trietilentioposforamida, busulfan, o cisplatino; antimetabolitos, tales como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, ácido fluoroacético o ácido fluorocítrico, antibióticos, tales como bleomicinas (v.g. sulfato de bleomicina), doxorubicina, daunorubicina, mitomicinas (v.g. mitomicina C), actinomicinas (v.g. dactinomicinas), plicamicina, calicamicina y derivados de la misma, o esperamicina y derivados de la misma, inhibidores mitóticos, tales como etoposido, vincristina o vinblastina y derivados de los mismos, alcaloides, tales como elipticina; polioles tales como taxicina-I o taxicina-II, hormonas tales como andrógenos (v.g. dromostanolona o testolactona), progestinas (v.g. acetato de megestrol o acetato de medroxi-progesterona), estrógenos (v.g., difosfato de dimetilestilbestrol, fosfato de poliestradiol o fosfato de estramustina) o antiestrógenos (v.g. tamoxifeno); antraquinonas, tales como mitoxantrona, ureas, tales como hidroxiaurea, hidrazinas, tales como procarbazona, o imidazoles, tales como dacarbazina.

Son grupos efectores particularmente útiles la calicamicina y los derivados de la misma (ver por ejemplo las Memorias de Patente Surafricanas Núms. 85/8794, 88(8127 y 90/2839).

Entre los metales quelados se incluyen quelatos de metales di- o tri-positivos que tienen un número de coordinación de 2 a 8 inclusive. Entre los ejemplos concretos de tales metales se incluyen tecnecio (Tc), renio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb), bismuto (Bi), indio (In), galio (Ga), itrio (Y), terbio (Tb), gadolinio (Gd) y escandio (Sc). En general el metal es preferiblemente un radionúclido. Entre los radionúclidos concretos se incluyen Tc^{99m} , Re^{186} , Co^{58} , Co^{60} , Cu^{67} , Au^{195} , Au^{199} , Au^{110} , Pb^{203} , Bi^{206} , Bi^{207} , In^{111} , Ga^{67} , Ga^{68} , Y^{88} , Y^{90} , Tb^{160} , Gd^{153} y Sc^{47} .

El metal quelado puede ser por ejemplo uno de los tipos de metal quelado anteriores con cualquier agente quelante polidentado adecuado, por ejemplo poliaminas acíclicas o cíclicas, poliéteres, (v.g. éteres corona y derivados de los mismos), poliamidas, porfirinas, y derivados carbocíclicos.

En general, el tipo de agente quelante dependerá del metal que se use. Un grupo particularmente útil de agentes quelantes en los productos conjugados según la invención, no obstante, son las poliaminas acíclicas y cíclicas, especialmente los ácidos poliaminocarboxílicos, por ejemplo el ácido dietil-triaminopentaacético y derivados de los mismos, y aminas macrocíclicas, v.g., derivados tri-aza y tetra-aza cíclicos (por ejemplo como se describe en la Memoria de la Patente Internacional Núm. WO 92/22583); y poliamidas, especialmente desferrioxamina y derivados de la misma.

De este modo por ejemplo cuando se desee utilizar un grupo tiol en el anticuerpo como punto de anclaje esto puede ser logrado por medio de una reacción con un grupo reactivo con tiol presente en la molécula efectora o informadora. Entre los ejemplos de tales grupos se incluyen un ácido o éster a-halocarboxílico, v.g., yodoacetamida, una imida, v.g., maleimida, una vinilsulfona, o un disulfuro. Estos y otros procedimientos de unión adecuados se describen generalmente y más concretamente en las Memorias de Patente Internacional Núms. WO 93/06231, WO 92/22583, WO 90/091195 y WO 89/01476.

Análisis para seleccionar moléculas que incrementan la densidad ósea

Como se ha discutido antes, la presente invención proporciona métodos para seleccionar y/o aislar compuestos que son capaces de incrementar la densidad ósea. Por ejemplo, en un aspecto de la presente invención se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprende las etapas de (a) mezclar una molécula seleccionada con proteína de unión a TGF-beta y un miembro seleccionado de la familia de proteínas TGF-beta, (b) determinar si la molécula seleccionada estimula la señalización por la familia de proteínas del TGF-beta, o inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta. En ciertas realizaciones, la molécula intensifica la capacidad del TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima.

En otros aspectos de la invención, se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, comprendiendo las etapas de (a) exponer una molécula seleccionada a células que expresen la proteína de unión a TGF-beta y (b) determinar si la expresión (o actividad) de la proteína de unión a TGF-beta de dichas células expuestas disminuye, y determinar a partir de allí si el compuesto es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso. En una realización, las células son seleccionadas del grupo formado por hueso humano normal transformado espontáneamente o no transformado de biopsias óseas y osteoblastos de hueso parietal de rata. Semejantes métodos pueden ser completados en una variedad de formatos de análisis incluyendo, por ejemplo, la Inmunolectroforesis Contracorriente (CIEP), los Radio-inmunoanálisis, las Radioinmuno precipitaciones, los Análisis de Absorción con Enzima Ligada (ELISA), y los análisis sandwich (ver las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.376.110 y 4.486.530, ver también *Antibodies: A Laboratory Manual, supra*).

Los elementos representativos de tales análisis son proporcionados más abajo en los Ejemplos 5 y 6. En resumen, un miembro de la familia de la súper-familia de TGF-beta o una proteína de unión de TGF-beta se une primero a una fase sólida, seguido de la adición de una molécula candidato. El miembro de la familia marcado de la súper-familia del TGF-beta o la proteína de unión a TGF-beta es añadido después al análisis, la fase sólida lavada, y la cantidad de miembro de la súper-familia de TGF-beta unido o marcado o de proteína de unión a TGF-beta del soporte sólido es determinada. Las moléculas que son adecuadas para su uso en el aumento del contenido mineral del hueso como se describe aquí son aquellas moléculas que disminuyen la unión de proteína de unión a TGF-beta a un miembro o miembros de la súper-familia del TGF-beta de una manera estadísticamente significativa. Obviamente, los análisis adecuados para su uso en la presente invención no deben estar limitados a las realizaciones descritas en los Ejemplos 2 y 3. En particular, se pueden alterar numerosos parámetros, por ejemplo uniendo el TGF-beta a una fase sólida, o eliminando completamente la fase sólida.

En otros aspectos de la invención, se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprende las etapas de (a) exponer una molécula seleccionada a células que expresan el TGF-beta y (b) determinar si la actividad de TGF-beta a partir de dichas células expuestas es alterada, y determinar a partir de allí si el compuesto es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso. De un modo similar a los métodos descritos antes, se pueden utilizar una amplia variedad de métodos para evaluar los cambios de expresión de la proteína de unión a TGF-beta debidos a un compuesto de ensayo seleccionado.

Por ejemplo, en un aspecto de la presente invención se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprenden las etapas de (a) mezclar una molécula seleccionada con proteína de unión a TGF-beta y un miembro seleccionado de la familia de proteínas de TGF-beta, (b) determinar si la molécula seleccionada sobre-regula la señalización de la familia de proteínas del TGF-beta, o inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta. En ciertas realizaciones, la molécula intensifica la capacidad del TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima.

De un modo similar a los métodos descritos antes, se puede utilizar una amplia variedad de métodos para evaluar la estimulación de TGF-beta debida a un compuesto de ensayo seleccionado. Uno de tales métodos representativos se proporciona más abajo en el Ejemplo 6 (ver también Durham y col., *Endo*, 136:1374-1380).

En otros aspectos más de la presente invención, se proporcionan los métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, comprendiendo la etapa de determinar si una molécula seleccionada inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta al hueso, o un análogo del mismo. Según se utiliza aquí, se debe entender que el hueso o los análogos del mismo hacen referencia a hidroxapatita o una superficie compuesta por una forma en polvo de hueso, hueso triturado o hueso intacto. De un modo similar a los métodos descritos antes, se pueden utilizar una amplia variedad de métodos para evaluar la inhibición de la localización de la proteína de unión a TGF-beta en la matriz ósea. Uno de tales métodos representativos se proporciona más abajo en el Ejemplo 7.

Se debe observar que mientras los métodos citados aquí pueden hacer referencia al análisis de una molécula de ensayo individual, la presente invención no debe estar limitada a ellos. En particular, la molécula seleccionada puede estar contenida en una mezcla de compuestos. Por tanto, los métodos citados pueden comprender adicionalmente la etapa de aislar una molécula que inhiba la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta.

Moléculas candidato

Se pueden analizar una amplia variedad de moléculas en cuanto a su capacidad para inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de TGF-beta. Entre los ejemplos representativos que se discuten con más detalle más abajo, se incluyen moléculas orgánicas, proteínas o péptidos, y moléculas de ácido nucleico. Aunque debe ser evidente a partir del estudio de más abajo que las moléculas candidato descritas aquí pueden ser utilizadas en los análisis descritos aquí, debe ser fácilmente evidente que tales moléculas también pueden ser utilizadas en una variedad de entornos de diagnóstico y terapéuticos.

1. Moléculas Orgánicas

Se pueden analizar numerosas moléculas orgánicas en cuanto a su capacidad para inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta.

Por ejemplo, en una realización de la invención se pueden seleccionar moléculas orgánicas adecuadas o bien a partir de una genoteca química, donde los agentes químicos son analizados individualmente, o bien a partir de genotecas químicas combinatorias en los que se analizan múltiples compuestos de una vez, después se descifran para determinar y aislar la mayor parte de los compuestos activos.

Entre los ejemplos representativos de tales genotecas químicas combinatorias se incluyen los descritos por Agraftotis y col., "System and method of automatically generating chemical compounds with desired properties", Patente de los Estados Unidos Núm. 5.463.564; Armstrong, R.W., "Synthesis of combinatorial arrays of organic compounds

through the use of multiple component combinatorial array syntheses”, WO 95/02566; Baldwin, J.J. y col., “Sulfonamide derivatives and their use”, WO 95/24186; Baldwin, J.J. y col., “Combinatorial dihydrobenzopyran library”, WO 95/30642; Brenner, S., “New kit for preparing combinatorial libraries”, WO 95/16918; Chenera, B. y col., “Preparation of library of resin-bound aromatic carbocyclic compounds”, WO 95/16712; Ellman, J.A., “Solid phase and combinatorial synthesis of benzodiazepine compounds on a solid support”, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.288.514; Felder, E. y col., “Novel combinatorial compound libraries”, WO 95/16209; Lerner, R. y col., “Encoded combinatorial chemical libraries”, WO 93/20242; Pavia, M.R. y col., “A method for preparing and selecting pharmaceutically useful non-peptide compounds from a structurally diverse universal library”, WO 95/04277; Summerton, J.E. y D.D. Weller, “Morpholino-subunit combinatorial library and method”, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.506.337; Holmes, C., “Methods for the Solid Phase Synthesis of Thiazolidinones, Metathiazonones, and Derivatives thereof”, WO 96/00148; Phillips, G.B. y G.P. Wei, “Solid-phase Synthesis of Benzimidazoles”, *Tet. Letters* 37:4887-90, 1996; Ruhland, B. y col., “Solid-supported Combinatorial Synthesis of Structurally Diverse β -Lactams”, *J. Amer. Chem. Soc.* 111:253-4, 1996; Look, G.C. y col., “The Identification of Cyclooxygenase-I Inhibitors from 4-Thiazolidinone Combinatorial Libraries”, *Bioorg. and Med. Chem. Letters* 6:707-12, 1996.

2. Proteínas y Péptidos

Del mismo modo se pueden utilizar una amplia gama de proteínas y péptidos como moléculas candidato para inhibidores de la unión de la proteína de unión a un miembro de la familia del TGF-beta.

a. Genotecas Peptídicas Combinatorias

Las moléculas peptídicas que son supuestos inhibidores de la unión de la proteína de unión al TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta pueden ser obtenidas a través del rastreo de genotecas peptídicas combinatorias. Tales genotecas pueden ser preparadas por un experto en la técnica (ver v.g., Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.528.266 y 4.359.535, y Publicación del Tratado de Cooperación de Patentes Núms. WO 92/15679, WO 92/15677, WO 90/07862, WO 90/02809, o adquiridos de fuentes asequibles comercialmente (v.g. New England Biolabs Ph.D.[®] Phage Display Peptide Library Kit).

b. Anticuerpos

Los anticuerpos que inhiben la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta puede ser fácilmente preparada dada la descripción proporcionada aquí. En el contexto de la presente invención, se entiende que los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-idiotípicos, fragmentos de anticuerpos (v.g., Fab, y F(ab')₂, regiones variables F_v, o regiones determinantes de la complementariedad). Como se ha estudiado antes, se entiende que los anticuerpos son específicos contra la proteína de unión a TGF-beta, o contra un miembro de la familia del TGF-beta específico, si se unen con una K_a mayor o igual a 10⁷ M, preferiblemente mayor o igual a 10⁸ M⁻¹, y no se unen a otras proteínas de unión a TGF-beta, o, se unen con una K_a menor o igual a 10⁶ M⁻¹. Además, los anticuerpos de la presente invención deben bloquear o inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de unión a TGF-beta.

La afinidad de un anticuerpo monoclonal o un patrón de unión; así como la inhibición de la unión se pueden determinar fácilmente por un experto normal en la técnica (ver, Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660-672, 1949).

En resumen, los anticuerpos monoclonales pueden ser generados fácilmente por un experto en la técnica a partir de una variedad de animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, diversas aves, conejos, ratones o ratas. Típicamente, la proteína de unión a TGF-beta o un péptido único de la misma de 13-20 aminoácidos (conjugado preferiblemente con hemocianina de lapa ojo de cerradura mediante entrecruzamiento con glutaraldehído) es utilizada para inmunizar al animal a través de inyecciones intraperitoneales, intramusculares, intraoculares, o subcutáneas, junto con un coadyuvante tal como el coadyuvante completo o incompleto de Freund. Después de varias inmunizaciones de refuerzo, se recogen las muestras de suero y se someten a ensayo en cuanto a la reactividad con la proteína o péptido. Los antisueros policlonales particularmente preferidos darán una señal en uno de estos análisis que es al menos tres veces mayor que el fondo. Una vez que el título del animal ha alcanzado una meseta en términos su reactividad con la proteína, se pueden obtener fácilmente cantidades mayores de antisueros o bien mediante tomas de sangre semanales, o bien mediante exanguinación del animal.

Los anticuerpos monoclonales también pueden ser generados fácilmente utilizando mecanismo convencionales (ver las Patentes de los Estados Unidos Núms. RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439, y 4.411.993, ver también *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kenett, McKearn, and Bechtol (eds.), 1980, y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

En resumen, en una realización se inmuniza un sujeto animal tal como una rata o ratón con la proteína de unión a TGF-beta o una porción de la misma como se ha descrito antes. La proteínas puede ser mezclada con un coadyuvante tal como coadyuvante completo o incompleto de Freund con el fin de incrementar la respuesta inmune resultante. Entre una y tres semanas después de la inmunización inicial el animal puede ser inmunizado de nuevo con otra inmunización de refuerzo, y sometido a ensayo en cuanto a la reactividad con la proteína utilizando los análisis descritos antes. Una

vez que el animal ha alcanzado una meseta en su reactividad con la proteína inyectada, éste se sacrifica, y los órganos que contienen un gran número de células B tales como el bazo y los nódulos linfáticos se cosechan.

Las células que se obtienen del animal inmunizado pueden ser immortalizadas mediante infección con un virus tal como el virus de Epstein-Barr (EBV) (ver Glasky and Reading, *Hybridoma* 8(4):377-389, 1989). Alternativamente, en una realización preferida, las suspensiones del bazo y/o los nódulos linfáticos cosechados son fusionadas con una célula de mieloma adecuada con el fin de crear un “hibridoma” que secreta anticuerpo monoclonal. Entre las líneas de mieloma adecuadas se incluye, por ejemplo, NS-1 (ATCC Núm. TIB 18), y P3X63 - Ag 8.653 (ATCC Núm. CRL 1580).

Tras la fusión, las células son colocadas en placas para el cultivo de tejidos conteniendo un medio adecuado, tal como RPMI 1640, o DMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco) (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), así como ingredientes adicionales, tales como suero bovino fetal (FBS, es decir, de Hyclone, Logan, Utah, o JRH Biosciences). Adicionalmente, el medio debe contener un reactivo que permita selectivamente el crecimiento de células de bazo y mieloma fusionadas tales como HAT (hipoxantina, aminopterina, y timidina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Después de aproximadamente siete días, las células fusionadas resultantes o hibridomas pueden ser rastreados con el fin de determinar la presencia de anticuerpos que sean reactivos contra la proteína de unión a TGF-beta (dependiendo del antígeno utilizado), y que bloqueen o inhiban la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta.

Se pueden utilizar una amplia variedad de análisis para determinar la presencia de anticuerpos que sean reactivos contra las proteínas de la presente invención, incluyendo por ejemplo la inmunoelectroforesis contracorriente, los radioinmunoanálisis, las radioinmunoprecipitaciones, los análisis de absorción con enzima ligada (ELISA), los análisis de transferencia puntual, las transferencias Western, la inmunoprecipitación, los análisis de inhibición o competitivos, y los análisis sandwich (ver las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.376.110 y 4.486.530; ver también *Antibodies: A Laboratory manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Tras numerosas diluciones y re-análisis clónicas, se puede aislar un hibridoma que produzca anticuerpos reactivos contra la proteína deseada.

Asimismo se pueden utilizar otras técnicas para construir anticuerpos monoclonales (ver William D. Huse y col., “Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda”, *Science* 246:1275-1281, Diciembre de 1989; ver también L. Sastry y col., “Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728-5732, Agosto de 1989; ver también Michelle Altling-Mees y col., “Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas”, *Strategies in Molecular Biology* 3:1-9, Enero 1990). Estas referencias describen un sistema comercial asequible de Stratagene (La Jolla, California) que permite la producción de anticuerpos por medio de mecanismos de recombinación. En resumen, el ARNm es aislado de una población de células B, y utilizado para crear genotecas de expresión de ADNc de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera en los vectores λ ImmunoZap(H) e ImmunoZap(L). Estos vectores pueden ser rastreados individualmente o expresados simultáneamente para formar fragmentos Fab o anticuerpos (ver Huse y col., *supra*; ver también Sastry y col., *supra*). Las placas positivas pueden ser convertidas con posterioridad en un plásmido no lítico que permita un elevado nivel de expresión de los fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de *E. coli*.

De un modo similar, también se pueden construir porciones o fragmentos, tales como fragmentos Fab y Fv, de anticuerpos utilizando mecanismos de digestión enzimática o de recombinación de ADN convencionales para incorporar las regiones variables de un gen que codifica un anticuerpo que se une específicamente. En una realización, los genes que codifican la región variable de un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de interés son ampliados utilizando cebadores nucleotídicos para la región variable. Estos cebadores pueden ser sintetizados por un experto normal en la técnica, o pueden ser adquiridos de fuentes asequibles comercialmente. Stratagene (La Jolla) vende cebadores para regiones variables de ratón y de humano incluyendo, entre otros, cebadores para las regiones V_{Ha} , V_{Hb} , V_{Hc} , V_{Hd} , C_{H1} , V_L y C_L . Estos cebadores pueden ser utilizados para amplificar las regiones variables de la cadena pesada o ligera, que pueden ser insertadas después en vectores tales como ImmunoZAP[®] H o ImmunoZAP[®] L (Stratagene), respectivamente. Estos vectores pueden ser introducidos después en *E. coli*, levaduras, o sistemas de expresión basados en mamíferos. Utilizando estos mecanismos, se pueden producir grandes cantidades de una proteína de cadena sencilla conteniendo una fusión de los dominios V_H y V_L (ver Bird y col., *Science* 242:423-426, 1988). Además, semejantes técnicas pueden ser utilizadas para cambiar un anticuerpo “de ratón” por un anticuerpo “humano”, sin alterar la especificidad de unión del anticuerpo.

Una vez que se han obtenido anticuerpos adecuados, éstos pueden ser aislados o purificados por medio de muchos mecanismos bien conocidos por los expertos normales en la técnica (ver *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Entre los mecanismos adecuados se incluyen columnas de afinidad de péptidos o proteínas, HPLC o RP-HPLC, purificación en columnas de proteína A o proteína G, o cualquier combinación de estos mecanismos.

c. Proteínas de unión a TGF-beta mutantes

Como se describe aquí y más abajo en los Ejemplos (v.g., Ejemplos 8 y 9), las versiones alteradas de la proteína de unión a TGF-beta que compiten con la capacidad de la proteína de unión a TGF-beta nativa para bloquear la actividad

de un miembro de la familia de 1 TGF-beta concreto deben conducir a un incremento de la densidad ósea. De este modo, los mutantes de la proteína de unión a TGF-beta que se unen al miembro de la familia del TGF-beta pero no inhiben la función del miembro de la familia del TGF-beta satisfarían el criterio. Las versiones mutantes deben competir eficazmente con las funciones inhibitoras endógenas de la proteína de unión a TGF-beta.

5

d. Producción de proteínas

Aunque aquí se proporcionan varios genes (o porciones de los mismos), se debe entender que en el contexto de la presente invención, la referencia a uno o más de estos genes incluye los derivados de los genes que son sustancialmente similares a los genes (y, cuando sea apropiado, las proteínas (incluyendo péptidos y polipéptidos) que están codificadas por los genes y sus derivados). Según se utiliza aquí, se cree que una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente similar" si: (a) la secuencia de nucleótidos está derivada de la región codificadora de los genes descritos antes e incluye, por ejemplo, porciones de la secuencia o variaciones alélicas de las secuencias comentadas antes, o alternativamente, codifica una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta, (b) la secuencia de nucleótidos es susceptible de hibridación con las secuencias de nucleótidos de la presente invención en condiciones moderadamente restrictivas, altamente restrictivas o muy restrictivas (ver Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989); o (c) las secuencias de ADN son degeneradas como resultado del código genético de las secuencias de ADN definidas en (a) o (b). Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico descrita aquí incluye secuencias tanto complementarias como no complementarias, siempre que las secuencias satisfagan de otro modo los criterios expuestos aquí. En el contexto de la presente invención, unas condiciones altamente restrictivas representan condiciones de hibridación normalizadas (v.g., 5XSSPE, SDS al 0,5% a 65°C, o equivalente).

La estructura de las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico descritas aquí puede ser pronosticada a partir de los productos de la traducción primarios utilizando la función de trazado del carácter hidrófobo, por ejemplo, de P/C Gene o Intelligenetics Suite (Intelligenetics, Mountain View, California), o según los métodos descritos por Kyte y Doolittle (*J. Mol. Biol.* 157:105-132, 1982).

Las proteínas de la presente invención pueden ser preparadas en forma de sales ácidas o alcalinas, o en forma neutra. Además, se pueden modificar los restos aminoácido individuales mediante oxidación o reducción. Además, se pueden realizar diversas sustituciones, deleciones, o adiciones en las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico, cuyo efecto neto es conservar o intensificar o reducir adicionalmente la actividad biológica de la proteína mutante o de tipo natural. Por otra parte, debido a la degeneración del código genético, por ejemplo, puede haber una considerable variación en las secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos.

35

Entre otros derivados de las proteínas descritas aquí se incluyen los productos conjugados de las proteínas junto con otras proteínas o polipéptidos. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la síntesis de proteínas de fusión N-terminales o C-terminales que pueden ser añadidas para facilitar la purificación o identificación de proteínas (ver la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.851.341, ver también, Hopp y col., *Bio/Technology* 6:1204, 1988). Alternativamente, se pueden construir proteínas de fusión tales como Flag/proteína de unión a TGF-beta con el fin de ayudar a la identificación, expresión y análisis de la proteína.

Las proteínas de la presente invención pueden ser construidas utilizando una amplia variedad de mecanismos descritos aquí. Adicionalmente, se pueden introducir mutaciones en loci concretos sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligadura a fragmentos que contienen una secuencia natural. Tras la ligadura, la secuencia reconstruida resultante codifica un derivado que tiene la inserción, sustitución, o delección deseada.

Alternativamente, se pueden emplear procedimientos de mutagénesis de sitio específico (o de segmento específico) dirigidas al oligonucleótido para proporcionar un gen alterado que tenga codones concretos alterados según la sustitución, delección, o inserción requerida. Los métodos ejemplares de elaboración de las alteraciones mostradas antes son descritas por Walder y col. (*Gene* 42:133, 1986); Bauer y col., (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, Enero 1985, 12-19); Smith y col., (*Genetic Engineering; Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); y Sambrook y col., (*supra*). Los derivados por delección o truncamiento de proteínas (v.g. una porción extracelular soluble) también pueden ser construidos utilizando sitios para endonucleasas de restricción convenientes adyacentes a la delección deseada. Después de la restricción, los salientes pueden ser rellenados, y el ADN religado. Los métodos ejemplares de elaboración de alteraciones mostrados antes son descritos por Sambrook y col., (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Las mutaciones que se realizan en las moléculas de ácido nucleico de la presente invención conservan preferiblemente el marco de lectura de las secuencias codificadoras. Además, las mutaciones no crearán preferiblemente regiones complementarias que hibriden para producir estructuras de ARNm secundarias, tales como bucles u horquillas, que afectarían adversamente a la traducción de ARNm. Aunque se puede pre-determinar el sitio de la mutación, no es necesario que la naturaleza de la mutación sea pre-determinada *per se*. Por ejemplo, con el fin de seleccionar características óptimas de los mutantes en un sitio dado, se puede realizar una mutagénesis al azar en el codón diana y los mutantes expresados rastreados en cuanto a una actividad biológica indicativa. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones en loci concretos sintetizando oligonucleótidos que contengan una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permitan la ligadura a fragmentos de la secuencia natural. Tras la ligadura, la

60

secuencia reconstruida resultante codifica un derivado que tiene la inserción, sustitución, o delección de aminoácidos deseada.

5 Las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de la presente invención también pueden ser construidas utilizando mecanismos de mutagénesis por PCR, mutagénesis química (Drinkwater y Klinedinst, *PNAS* 83:34022-3406, 1986), mediante la incorporación errónea de un nucleótido forzada (v.g., Liao y Wise *Gene* 88:107-111, 1990), o mediante el uso de oligonucleótidos mutagenizados al azar (Horwitz y col., *Genome* 3:112-117, 1989).

10 La presente invención también proporciona la manipulación y la expresión de los genes descritos antes cultivando células huésped que contienen un vector capaz de expresar los genes descritos antes. Entre tales vectores o constructos de vectores se incluyen moléculas de ácido nucleico derivadas de ADNc o sintéticas que codifican la proteína deseada, que están conectadas operablemente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción adecuados. Los elementos reguladores adecuados pueden estar derivados de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamífero, de insecto, o vegetales. La selección de los elementos reguladores apropiados depende de una de las células huésped seleccionadas, y puede ser completada fácilmente por un experto normal en la técnica. Entre los ejemplos de los elementos reguladores se incluyen: un promotor y un intensificador transcripcionales o una secuencia de unión a la ARN polimerasa, un terminador transcripcional, y una secuencia de unión al ribosoma, incluyendo una señal de inicio de la traducción.

20 Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las proteínas descritas antes pueden ser fácilmente expresadas por una amplia variedad de células huésped procarióticas o eucarióticas, incluyendo células bacterianas, de mamífero, levaduras u otros hongos, virales, de insecto, o vegetales. Los métodos para transformar o transfectar tales células para expresar el ADN foráneo son bien conocidos en la técnica (ver, v.g., Itakura y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.704.362; Hinnen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933, 1978; Murray y col., Patente de los Estados Unidos Núm.4.801.542; Upshall y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.935.349; Hagen y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.784.950; Axel y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.399.216; Goeddel y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.766.075; y Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; para células vegetales ver Czako y Marton, *Plant Physiol.* 104:1067-1071, 1994; y Paszkowski y col., *Biotech.* 24:387-392, 1992).

30 Entre las células huésped bacterianas adecuadas para llevar a cabo la presente invención se incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, así como muchas otras especies bacterianas bien conocidas por un experto normal en la técnica. Entre los ejemplos representativos de las células huésped bacterianas se incluyen DH5 α (Stratagene, La Jolla, California).

35 Los vectores de expresión bacteriana comprenden preferiblemente un promotor que funcione en la célula huésped, uno o más marcadores fenotípicos seleccionables, y un origen de replicación bacteriano. Entre los promotores representativos se incluye la β -lactamasa (penicilinas) y el sistema promotor de la lactosa (ver Chang y col., *Nature* 275:615, 1978), el promotor de la ARN polimerasa de T7 (Studier y col., *Meth. Enzymol.* 185:60-89, 1990) el promotor lambda (Elvin y col., *Gene* 87:123-126, 1990), el promotor trp (Nichols y Yanofsky, *Meth. In Enzymology* 101:155, 1983) y el promotor tac (Russell y col., *Gene* 20:231, 1982). Entre los marcadores seleccionables representativos se incluyen diversos marcadores de resistencia a antibióticos tales como los genes de resistencia a kanamicina o ampicilina. Muchos plásmidos adecuados para transformar células huésped son bien conocidos en la técnica, incluyendo entre otros, pBR322 (ver Bolivar y col., *Gene* 2:95, 1977), los plásmidos de pUC pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (ver Messing, *Meth. in Enzymology* 101:20-77, 1983 y Vieira y Messing, *Gene* 19:259-268, 1982), y pNH8A, pNH16a, pNH18a, y Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, California).

50 Entre las células huésped de levaduras y hongos adecuadas para llevar a cabo la presente invención se incluyen, entre otros, *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, los géneros *Pichia* o *Kluyveromyces* y diversas especies del género *Aspergillus* (McKnight y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.935.349). Entre los vectores de expresión adecuados para las levaduras y hongos se incluyen, entre otros, YCp50 (ATCC Núm. 37419) para levaduras, y el vector de clonación de amdS pV3 (Turnbull, *Bio/Technology* 7:169, 1989), YRp7 (Struhl y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035-1039, 1978), YEp13 (Broach y col., *Gene* 8:121-133, 1979), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, *Nature* 275:104-108, 1978) y derivados de los mismos.

55 Entre los promotores preferidos para su uso en levaduras se incluyen los promotores de genes glicolíticos de levaduras (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.* 255:12073-12080, 1980; Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:419-934, 1982) o genes de la alcohol deshidrogenasa (Young y col., en *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, Hollaender y col., (eds.), pág. 355, Plenum Nueva York, 1982; Ammerer, *Meth. Enzymol.* 101:192-201, 1983). Entre los ejemplos útiles de los promotores de hongos se incluyen aquellos derivados de los genes glicolíticos de *Aspergillus nidulans*, tales como el promotor *adh3* (McKnight y col., *EMBO J.* 4:2093-2099, 1985). Las unidades de expresión también pueden incluir un terminador transcripcional. Un ejemplo de un terminador adecuado es el terminador *adh3* (McKnight y col., *ibid.*, 1985).

65 Como con los vectores bacterianos, los vectores de levadura incluirán generalmente un marcador seleccionable, que puede ser uno de los numerosos genes que muestran un fenotipo dominante para el cual existe un análisis fenotípico para permitir la selección de los transformantes. Los marcadores seleccionables preferidos son aquellos que complementan la auxotrofia de la célula huésped, proporcionan resistencia a antibióticos o permiten a una célula uti-

lizar fuentes de carbono específicas, e incluyen *leu2* (Broach y col., *ibid.*), *ura3* (Botstein y col., *Gene* 8:17, 1979), o *his3* (Struhl y col., *ibid.*). Otro marcador seleccionable adecuado es el gen *cat*, que confiere resistencia al cloramfenicol a células de levadura.

5 Las técnicas para transformar hongos son bien conocidas en la literatura, y han sido descritas, por ejemplo, por Beggs (*ibid.*), Hinnen y col., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933, 1978), Yelton y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1740-1747, 1984), y Russell (*Nature* 301:167-169, 1983). El genotipo de la célula huésped puede contener un defecto genético que sea complementado por el marcador seleccionable presente en el vector de expresión. La elección de un huésped y un marcador seleccionable concretos está dentro del nivel del experto normal en la técnica.

10 Los protocolos para la transformación de levaduras son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, se puede completar fácilmente o bien la preparación de esferoplastos de levadura con ADN (ver Hinnen y col., *PNAS USA* 75:1929, 1978) o mediante tratamiento con sales alcalinas tales como LiCl (ver Itoh y col., *J. Bacteriology* 153:163, 1983). La transformación de hongos también se puede llevar a cabo utilizando polietilenglicol como describen Cullen y col., (*Bio/Technology* 5:369,1987).

20 Entre los vectores virales se incluyen aquellos que comprenden un promotor que dirige la expresión de una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una proteína deseada como se ha descrito antes. Se puede utilizar una amplia variedad de promotores en el contexto de la presente invención, incluyendo por ejemplo, promotores tales como MoMLV LTR, RSV LTR, Friend MuLV LTR, promotores adenovirales (Ohno y col., *Science* 265:781-784, 1994), el promotor/intensificador de la fosfotransferasa de neomicina, el promotor del parvovirus tardío (Koering y col., *Hum. Gene Therap.* 5:457-463, 1994), el promotor TK del Herpes, el promotor de SV40, el intensificador/promotor del gen IIa de la metalotioneína, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, y el promotor tardío inmediato de citomegalovirus. En las realizaciones particularmente preferidas de la invención, el promotor es un promotor específico del tejido (ver, v.g., WO 91/02805; EP 0.415.731; y WO 90/07936). Entre los ejemplos representativos de los promotores específicos de tejidos adecuados se incluyen el promotor de la enolasa específica neural, el promotor del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas, el promotor de la proteína morfogénica del hueso, el promotor de la alfa1-quimerina humana, el promotor de la sinapsina I y el promotor de la sinapsina II. Además de los promotores indicados antes, se pueden utilizar otros promotores específicos de virus (v.g., promotores retrovirales, (incluyendo los indicados antes, así como otros tales como los promotores del HIV), promotores específicos de la hepatitis, el herpes (v.g., EBV), y bacterianos, fúngicos o parasíticos (v.g., malaria) con el fin de elegir como diana una célula o tejido específico que esté infectado con un virus, bacteria, hongo o parásito.

35 Entre las células de mamífero adecuadas para llevar a cabo la presente invención se incluyen, entre otros COS, CHO, SaOS, osteosarcomas, KS483, MG-63, osteoblastos primarios, y estroma de médula ósea de humano o mamífero. Entre los vectores de expresión en mamíferos para su uso en la realización de la presente invención se incluirán un promotor capaz e dirigir la transcripción de un gen clonado o un ADNc. Entre los promotores preferidos se incluyen promotores virales y promotores celulares. Entre los promotores específicos del hueso se incluyen la sialo-proteína ósea y el promotor de la osteocalcina. Entre los promotores virales se incluyen el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (Boshart y col., *Cell* 41:521-530, 1985), el promotor tardío inmediato de citomegalovirus, el promotor de SV40 (Subramani y col., *Mol. Cell. Biol.* 1:854-864, 1981), MMTV LTR, RSV LTR, metalotioneína-1, adenovirus E1a. Entre los promotores celulares se incluyen el promotor de la metalotioneína-1 de ratón (Palmiter y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.579.821), un promotor V_K de ratón (Bergman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7041-7045, 1983; Grant y col., *Nucl. Acids Res.* 15:5496, 1987) y un promotor V_H de ratón (Loh y col., *Cell* 33:85-93, 1983). La elección del promotor dependerá, al menos en parte, del nivel de expresión deseado o de la línea celular receptora que vaya a ser transfectada.

50 Tales vectores de expresión también pueden contener un grupo de sitios de empalme de ARN localizados aguas abajo del promotor y aguas arriba de la secuencia de ADN que codifica el péptido o la proteína de interés. Los sitios de empalme de ARN preferidos pueden ser obtenidos a partir de adenovirus y/o genes de inmunoglobulina. También se encuentra contenida en el vector de expresión una señal de poliadenilación localizada aguas abajo de la secuencia codificadora de interés. Entre las señales de poliadenilación adecuadas se incluyen las señales de poliadenilación temprana o tardía de SV40 (Kaufman y Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación de la región E1B de Adenovirus 5 y el terminador del gen de la hormona de crecimiento humana (De Noto y col., *Nucl. Acids Res.* 9:3719-3730, 1981). Los vectores de expresión pueden incluir una secuencia líder viral no codificadora, tal como el líder tripartito de Adenovirus 2, localizado entre el promotor y los sitios de empalme del ARN. Entre los vectores preferidos se pueden incluir también secuencias intensificadoras, tales como el intensificador de SV40. Los vectores de expresión también pueden incluir secuencias que codifican los ARN Va de adenovirus. Los vectores de expresión adecuados pueden ser obtenidos a partir de fuentes comerciales (v.g., Stragene, La Jolla, California).

60 Los constructos vectores que comprenden secuencias de ADN clonadas pueden ser introducidos en células de mamífero, por ejemplo, mediante transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler y col., *Cell* 14:725; Corsar y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603,1981; Graham y Vand der Eb, *Virology* 52:456, 1973), electroporación (Neumann y col., *EMBO J.* 1:841-845, 1982), o transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel y col., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987). Para identificar células que tengan integrado establemente el ADNc clonado, generalmente se introduce un marcador seleccionable en las células junto con el gen o el ADNc de interés. Entre los marcadores seleccionables preferidos para su uso en células de mamífero cultivadas se incluyen los genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, higromicina, y metotrexato. El mar-

gador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Los marcadores seleccionables amplificables preferidos son el gen DHFR y el gen de resistencia a la neomicina. Los marcadores seleccionables son revisados por Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts).

5 Las células de mamífero que contienen un vector adecuado se dejan crecer durante un período de tiempo, típicamente 1-2 días, para empezar a expresar la secuencia o las secuencias de ADN de interés. La selección del fármaco es aplicada después para seleccionar el crecimiento de las células que están expresando el marcador seleccionable de una manera estable. Para las células que han sido transfectadas con un marcador amplificable, seleccionable se puede incrementar la concentración de fármaco por etapas para seleccionar el número de copias de las secuencias aumentado de las secuencias clonadas, incrementando de ese modo los niveles de expresión. Las células que expresan las 10 secuencias introducidas son seleccionadas y rastreadas en cuanto a la producción de la proteína de interés en la forma deseada o al nivel deseado. Las células que satisfacen estos criterios pueden ser clonadas después y aumentadas a escala para la producción.

15 Los protocolos para la transfección de células de mamífero son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Entre los métodos representativos se incluyen la transfección con fosfato de calcio, la electroporación, la lipofección, la transfección mediada por fusión retroviral, adenoviral y de protoplastos (ver Sambrook y col., *supra*). Asimismo pueden ser absorbidos constructos vectores desnudos por las células musculares u otras células adecuadas después de la inyección en el músculo de un mamífero (u otro animal).

20 Numerosas células huésped de insecto conocidas en la técnica pueden resultar útiles en la presente invención, a la luz de la memoria sujeto. Por ejemplo, el uso de baculovirus como vectores para expresar secuencias de ADN heterólogo en células de insecto ha sido revisado por Atkinson y col. (*Pestic. Sci.* 28:215-224, 1990).

25 Numerosas células huésped vegetales conocidas en la técnica pueden asimismo resultar útiles en la presente invención a la luz de la memoria sujeto. Por ejemplo, el uso de *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar genes en células vegetales ha sido revisado por Sinkar y col. (*J. Biosci.* (Bangalore) 11:47-58, 1987).

30 En aspectos relacionados de la presente invención, las proteínas de la presente invención pueden ser expresadas en un animal transgénico cuyas células germinales y células somáticas contienen un gen que codifica la proteína deseada y que están conectadas operablemente a un promotor eficaz para la expresión del gen. Alternativamente, de una manera similar se puede preparar animales transgénicos que carezcan del gen deseado (v.g., ratones con un gen desactivado). Semejantes transgénicos pueden ser preparados en una variedad de animales no humanos, incluyendo ratones, ratas, 35 conejos, ovejas, perros, cabras y cerdos (ver Hammer y col., *Nature* 315:680-683, 1985, Palmiter y col., *Science* 222:809-814, 1983, Brinster y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442, 1985, Palmiter y Brinster, *Cell* 41:343-345, 1985, y Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.175.383, 5.087.751, 4.736.866, 5.387.742, 5.347.075, 5.221.778, y 5.175.384). Brevemente, un vector de expresión, incluyendo una molécula de ácido nucleico que va a ser expresada junto con secuencias para el control de la expresión situadas adecuadamente, es introducido en pronúcleos de huevos fertilizados, por ejemplo, mediante microinyección. La integración del ADN inyectado es detectada mediante análisis 40 de transferencia de ADN desde las muestras de tejido. Se prefiere que el ADN introducido sea incorporado a la línea germinal del animal de manera que pase a la progenie del animal. La expresión específica de tejidos puede ser lograda por medio del uso de un promotor específico de tejidos, o por medio del uso de un promotor inducible, tal como el gen promotor de la metalotioneína (Palmiter y col., 1983, *ibid.*), que permita la expresión regulada del transgen.

45 Las proteínas pueden ser aisladas, entre otros métodos, cultivando sistemas huésped y vectores adecuados para producir los productos de traducción recombinantes de la presente invención. Los sobrenadantes de tales líneas celulares, o las inclusiones de proteína o las células completas en las que la proteína es excretada al sobrenadante, pueden ser preparados después mediante una variedad de procedimientos de purificación con el fin de aislar las proteínas deseadas. Por ejemplo, el sobrenadante puede ser concentrado primero utilizando filtros de concentración de proteínas 50 asequibles comercialmente, tales como una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la concentración, el producto concentrado puede ser aplicado a una matriz de purificación adecuada tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-proteína unido a un soporte adecuado. Alternativamente, se pueden emplear resinas de intercambio aniónico o catiónico con el fin de purificar la proteína. Como alternativa adicional, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) para purificar adicionalmente la proteína. Otros métodos de aislamiento de las proteínas de la presente invención son bien conocidos por los expertos 55 en la técnica.

60 Se cree que una proteína está "aislada" en el contexto de la presente invención si no se detecta otra proteína (no deseada) conforme al análisis de SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie. En otras realizaciones, la proteína deseada puede ser aislada de manera que no se detecte otra proteína (no deseada) conforme al análisis de SDS-PAGE seguido de tinción con plata.

3. Moléculas de Ácido Nucleico

65 En otros aspectos de la invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que son capaces de inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta. Por ejemplo, en una realización se proporcionan moléculas oligonucleotídicas antisentido que inhiben específicamente la expresión de las secuencias

de ácido nucleico de la proteína de unión a TGF-beta (ver generalmente, Hirashima y col., en *Molecular Biology of ARN: New Perspectives* (M. Inouye y B.S. Dudock, eds., 1987 Academic Press, San Diego, pág. 401); *Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression* (J.S. Cohen, ed., 1989 MacMillan Press, Londres); Stein y Cheng, *Science* 261:1004-1012, 1993; WO 95/10607; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.359.051; WO 92/06693; y EP-A2-612844). Brevemente, tales moléculas son construidas de manera que sean complementarias, y sean capaces de formar pares de bases de Watson-Crick, con una región de secuencia de ARNm de la proteína de unión a TGF-beta transcrita. El ácido de doble hebra resultante interfiere en la posterior maduración del ARNm, evitando de ese modo la síntesis de proteínas (ver Ejemplo 10).

En otros aspectos de la invención, se proporcionan ribozimas que son capaces de inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta. Según se utiliza aquí, se pretende que "ribozimas" incluya moléculas de ARN que contengan secuencias antisentido para el reconocimiento específico, y una actividad enzimática de escisión del ARN. La hebra catalítica escinde un sitio específico en un ARN diana a una concentración mayor de la estequiométrica. Se pueden utilizar una amplia variedad de ribozimas en el contexto de la presente invención, incluyendo por ejemplo, la ribozima cabeza de martillo (por ejemplo, como describen Forster y Symons, *Cell* 48:211-220, 1987; Haseloff y Gerlach, *Nature* 328:596-600, 1988; Walbot y Bruening, *Nature* 334:196, 1988; Haseloff y Gerlach, *Nature* 334:585, 1988); la ribozima en horquilla (por ejemplo, como describen Haseloff y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.254.678, expedida el 19 de Octubre de 1993, y Hempel y col., Solicitud de Patente Europea Núm. 0.360.257, publicada el 26 de Marzo de 1990); y ribozimas basadas en el ARN ribosomal de *Tetrahymena* (ver Cech y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.987.071). Las ribozimas de la presente invención constan típicamente de ARN, pero también pueden estar compuestas por ADN, análogos de ácido nucleico (v.g., fosforotioatos), o quiméricos de los mismos (v.g., ADN/ARN/ARN).

4. Marcas

El producto génico o cualquiera de las moléculas candidato descritas antes y más abajo, pueden estar marcadas con una variedad de compuestos, incluyendo por ejemplo, moléculas fluorescentes, toxinas, y radionúclidos. Entre los ejemplos representativos de moléculas fluorescentes se incluyen fluoresceína, proteínas *Phycobili*, tales como ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y luciferasa. Entre los ejemplos representativos de las toxinas se incluyen ricina, abrina, toxina de la difteria, toxina del cólera, gelonina, proteína antiviral de *Phytolacca americana* ("pokeweed"), tritina, toxina de *Sigella*, y exotoxina A de *Pseudomonas*. Entre los ejemplos representativos de los radionúclidos se incluyen Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Ph-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 y Bi-212. Además, los anticuerpos descritos antes también pueden ser marcados o conjugados con un par de unión al ligando. Entre los ejemplos representativos se incluyen avidina-biotina, y riboflavina-proteína de unión a riboflavina.

Los métodos para conjugar o marcar las moléculas descritas aquí con las marcas representativas mostradas antes pueden ser fácilmente completados por un experto normal en la técnica (ver *Trichothecene Antibody Conjugate*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.744.981; *Antibody Conjugate*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.106.951; *Fluorogenic Materials and Labeling Techniques*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.018.884; *Metal Radionuclide Labeled Proteins for Diagnosis and Therapy*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.897.255; y *Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.988.496; ver también Inman, *Methods In Enzymology*, Vol. 34, *Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B*, Jackoby y Wilchek (eds.), Academic Press, Nueva York, pág. 30, 1974; ver también Wilchek y Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications", *Anal. Biochem.* 171:1-32, 1988).

Composiciones farmacéuticas

Como se ha observado antes, la presente invención también proporciona una variedad de composiciones farmacéuticas, que comprenden una de las moléculas descritas antes que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta junto con un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable, excipientes o diluyentes. Generalmente, tales portadores pueden ser no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Normalmente, la preparación de tales composiciones abarca combinar el agente terapéutico con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con seralbúmina no específica son diluyentes apropiados ejemplares.

Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser preparadas para su administración mediante una variedad de rutas diferentes. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser colocadas en recipientes, junto con material de envasado que proporcione instrucciones referentes al uso de tales composiciones farmacéuticas. Generalmente, semejantes instrucciones incluirán una expresión tangible describiendo la concentración de reactivo, así como ciertas realizaciones, cantidades relativas de ingredientes excipientes o diluyentes (v.g., agua, solución salina o PBS) que pueden ser necesarias para reconstituir la composición farmacéutica.

Métodos de tratamiento

La presente invención también proporciona la fabricación de medicamentos para incrementar el contenido mineral y la densidad mineral del hueso. En resumen, numerosas condiciones dan como resultado la pérdida de contenido mineral del hueso, incluyendo por ejemplo, las enfermedades, la predisposición genética, los accidentes que producen la pérdida de uso de un hueso (v.g. debido a una fractura), los agentes terapéuticos que afectan a la resorción ósea, o que eliminan células formadoras de hueso y el envejecimiento normal. Por medio del uso de las moléculas descritas aquí que inhiben la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta para fabricar medicamentos se pueden tratar o prevenir tales condiciones. Según se utiliza aquí, se debe entender que el contenido mineral del hueso ha aumentado, si el contenido mineral del hueso ha aumentado de una manera estadísticamente significativa (v.g., mayor de media desviación estándar), en un sitio seleccionado.

Las moléculas descritas aquí pueden ser utilizadas en la fabricación de medicamentos para tratar una amplia variedad de condiciones que resultan de la pérdida de contenido mineral del hueso. Los pacientes con tales condiciones pueden ser identificados a través de la diagnosis clínica utilizando mecanismos bien conocidos (ver, v.g., Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, Inc.). Entre los ejemplos representativos de las enfermedades que pueden ser tratadas se incluyen las displasias, en las que existe un crecimiento o desarrollo anormal del hueso. Entre los ejemplos representativos de tales condiciones se incluyen acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, enfermedad de Marfan, exostosis hereditaria múltiple, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoikilosis, lesiones escleróticas, fracturas, enfermedad periodontal, pseudoartrosis y osteomielitis piogénica.

Entre otras condiciones que pueden ser tratadas o evitadas utilizando los medicamentos de la invención se incluyen una amplia variedad de causas de osteopenia (es decir, una condición que ocasiona una desviación estándar mayor de uno de contenido mineral o densidad del hueso por debajo del contenido mineral esquelético pico en la juventud). Entre los ejemplos representativos de tales condiciones se incluyen los estados anémicos, las condiciones causadas por esteroides, las condiciones causadas por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia en calcio, osteoporosis idiopática, osteopenia y osteoporosis congénita, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, senectud, estado post-menopáusico, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, *diabetes melitus*, hipertiroidismo, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional transitoria y osteomalacia.

En un aspecto la presente invención proporciona el uso de una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta en la fabricación de un medicamento para incrementar el contenido mineral o la densidad del hueso de un animal de sangre caliente proporcionando el medicamento una cantidad eficaz de la molécula. Entre los ejemplos de los animales de sangre caliente que se pueden tratar se incluyen tanto vertebrados como mamíferos, incluyendo por ejemplo, caballos, vacas, cerdos, ovejas, perros, gatos, ratas y ratones. Entre los ejemplos representativos de las moléculas terapéuticas se incluyen ribozimas, genes de ribozimas, oligonucleótidos antisentido y anticuerpos (v.g., anticuerpos humanizados).

En otros aspectos la presente invención comprende introducir en las células que buscan el hueso un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta, después tales células pueden ser utilizadas en la fabricación de un medicamento para incrementar la densidad del hueso en un animal de sangre caliente. Brevemente, las células que buscan el hueso pueden ser obtenidas directamente a partir del hueso de pacientes (v.g., células obtenidas a partir de médula ósea tales como CD34+, osteoblastos, osteocitos, y similares), a partir de sangre periférica, o a partir de cultivos.

Un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la unión de una proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta es introducido en las células. Entre los ejemplos representativos de los vectores adecuados se incluyen vectores virales tales como vectores virales del herpes (v.g., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.288.641), vectores adenovirales (v.g., WO 94/26914, WO 93/9191; Kolls y col., *PNAS* 91(1):215-219, 1994; Kass-Eisler y col., *PNAS* 90(24):11498-502, 1993; Guzman y col., *Circulation* 88(6):2838-48, 1993; Guzman y col., *Cir. Res.* 73(6):1202-1207, 1993; Zabner y col., *Cell* 75(2):207-216, 1993; Li y col., *Hum Gene Ther.* 4(4):403-409, 1993; Caillaud y col., *Eur. J. Neurosci.* 5(10):1287-1291, 1993; Vincent y col., *Nat. Genet.* 5(2):130-134, 1993; Jaffe y col., *Nat. Genet.* 1(5):372-378, 1992; y Levrero y col., *Gene* 101(2):195-202, 1991), vectores virales adenoasociados (WO 95/13365; Flotte y col., *PNAS* 90(22):10613-10617, 1993), vectores de baculovirus, vectores de parvovirus (Koering y col., *Hum. Gene Therap.* 5:457-463, 1994), vectores de poxvirus (Panicali y Paoletti, *PNAS* 79:4927-4931, 1982; y Ozaki y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193(2):653-660, 1993), y retrovirus (v.g., EP 0.415.731; WO 90/07936; WO 91/0285; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.219.740; WO 93/11239; WO 93/10218). Del mismo modo se pueden construir vectores virales que contengan una mezcla de elementos diferentes (v.g., promotores, secuencias de la envuelta y similares) de diferentes virus, o fuentes no virales. En varias realizaciones, se puede utilizar o bien el propio vector viral, o bien una partícula viral que contenga el vector viral en los métodos y composiciones descritos más abajo.

En otras realizaciones de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican una molécula que inhibe la unión de una proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta por sí mismas pueden ser administradas mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, la administración a asialomucoide (ASOR) conjugado con complejos de poli-L-lisina ADN (Cistano y col., *PNAS* 92122-92126, 1993), ADN unido a adenovirus

muerto (Curiel y col., *Hum. Gene Ther.* 3(2):147-154, 1992), introducción mediada por citofectina (DMRIE-DOPE, Vical, California), inyección de ADN directa (Acsadi y col., *Nature* 352:815-818, 1991); ligandos de ADN (Wu y col., *J. of Biol. Chem.* 264:16985-16987, 1989); lipofección (Felgner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989); liposomas (Pickering y col., *Circ.* 89(1):13-21, 1994; y Wang y col., *PNAS* 84:7851-7855, 1987); bombardeo con microproyectiles (Williams y col., *PNAS* 88:2726-2730, 1991); y liberación directa de ácido nucleico que codifican la propia proteína ya sea sola (Vile y Hart, *Cancer Res.* 53:3860-3864, 1993) o utilizando complejos de PEG-ácido nucleico.

Entre los ejemplos representativos de las moléculas que pueden ser expresadas por los vectores de la presente invención se incluyen ribozimas y moléculas antisentido, cada uno de las cuales se ha discutido con más detalle antes.

La determinación del contenido mineral del hueso incrementado puede ser resuelta directamente por medio del uso de los rayos x (v.g., Dual Energy X-ray Absorptometry o "DEXA"), o mediante inferencia a través de marcadores de recambio óseo (fosfatasa alcalina específica de osteoblastos, osteocalcina, procolágeno de tipo 1, propéptido C' (PICP), y fosfatasa alcalina total; ver Comier, C., *Curr. Opin. In Rheu.* 7:243, 1995), o marcadores de resorción ósea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido, hidroxiprolina urinaria, fosfatasas ácidas tartrato-resistentes del plasma y galactosilhidroxilisina; ver Comier, *supra*). La cantidad de masa ósea puede ser calculada a partir de los pesos corporales, o utilizando otros métodos (ver Guinness-Hey, *Metab. Bone Dis. And Rel. Res.* 5:177-181, 1984).

Como resultará evidente para un experto en la técnica, la cantidad y la frecuencia de la administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y gravedad de la indicación que esté siendo tratada, de la respuesta deseada, de la condición del paciente, etcétera. Típicamente, las composiciones pueden ser administradas mediante una variedad de técnicas, como se ha indicado antes.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Mapas de esclerostiosis para el brazo largo del cromosoma 17 humano

El cartografiado genético del defecto responsable de la esclerosteosis en humanos localizó el gen responsable de este trastorno en la región del cromosoma 17 humano que codifica un miembro novedoso de la familia de la proteína de unión al TGF-beta. En la esclerosteosis, el hueso esquelético presenta un incremento sustancial en la densidad mineral en relación con la de los individuos no afectados. El hueso de la cabeza también presenta un sobrecrecimiento. Los pacientes con esclerosteosis son generalmente sanos aunque pueden mostrar grados variables de sindactilia al nacer y grados variables de compresión craneal y compresión nerviosa en la calavera.

El análisis de conexión del defecto del gen asociado con la esclerosteosis fue realizado aplicando el método del cartografiado por homocigosidad a muestras de ADN recogidas de 24 familias de Afrikaner de Suráfrica en las cuales se producía la enfermedad. (Sheffield y col., 1994, *Human Molecular Genetics* 3:1331-1335. "Identification of a Badet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping"). La población Afrikaner de Suráfrica es generalmente homogénea; la población descende de un pequeño número de fundadores que colonizaron el área hace varios siglos, y ha estado aislada por barreras geográficas y sociales desde su fundación. La esclerosteosis es rara en todo el mundo fuera de la comunidad Afrikaner, lo que sugiere que se encontraba presente una mutación en el gen en la población fundadora y ha aumentado de número junto con el crecimiento de la población. El uso del cartografiado de homocigosidad se basa en la suposición de que es probable que los marcadores del cartografiado del ADN adyacentes a una mutación recesiva sean homocigotos en los individuos afectados de familias consanguíneas y en poblaciones aisladas.

Se seleccionó un grupo de 371 marcadores microsatélites (Research Genetics, Set 6) de los cromosomas autosómicos para tipificar reservas de ADN de muestras de pacientes con esclerosteosis. Las muestras de ADN para este análisis procedían de 29 pacientes con esclerosteosis de 24 familias, 59 miembros de familias no afectadas y un grupo de individuos de control no emparentados de la misma población. Las reservas constaban de 4-6 individuos, individuos afectados, individuos afectados de familias consanguíneas, padres y hermanos no afectados, o controles no emparentados. En las reservas de individuos no relacionados y en la mayor parte de las reservas con individuos afectados o miembros de la familia, los análisis de los marcadores demostraron numerosos tamaños de alelos para cada marcador. Un marcador, D17S1299, mostraba una indicación de homocigosidad: una banda en algunas de las reservas de individuos afectados.

Las 24 familias con esclerosteosis fueron tipificadas con un total de 19 marcadores en la región D17S1299 (en 17q12-q21). Los individuos afectados de cada familia demostraron ser homocigotos en esta región, y 25 de los 29 individuos eran homocigotos para un haplotipo central; cada uno tenía los mismos alelos entre D17S1787 y D17S930. Los otros cuatro individuos tenían un cromosoma que se emparejaba con este haplotipo y un segundo que no. En suma, los datos sugerían de modo convincente que esta región de 3 megabases contenía la mutación de la esclerosteosis. El análisis de la secuencia de la mayor parte de los exones de esta región de 3 megabases identificaba una mutación terminadora en la secuencia codificadora de la proteína de unión a TGF novedosa (mutación C>T en la posición 117

ES 2 272 093 T3

del SEQ ID NO. 1 da como resultado un codón de terminación). Se demostró que esta mutación era única para los pacientes con esclerosteosis y los portadores de los descendientes de Afrikaaner. La identidad del gen fue confirmada adicionalmente identificando una mutación en su intrón (mutación A>T en la posición +3 del intrón) que da como resultado una maduración del ARNm inapropiada en un paciente no emparentado, individual con esclerosteosis diagnosticada.

Ejemplo 2

10 *Especificidad de tejidos de la expresión del gen de la proteína de unión a TGF-beta*

A. *Expresión del Gen Beer Humano mediante RT-PCR*

Se preparó un ADNc de primera hebra a partir de las siguientes muestras de ARN total utilizando un estuche asequible comercialmente ("Superscript Pre-amplification System for First Strand cDNA Synthesis", Life Technologies, Rockville, MD): cerebro humano, hígado humano, bazo humano, timo humano, placenta humana, músculo esquelético humano, tiroides humano, pituitaria humana, osteoblastos humanos (NHOst de Clonetics Corp., San Diego, CA), línea celular de osteosarcoma humano (Saos-2, ATCC# HTB-85), hueso humano, médula ósea humana, cartílago humano, hueso de mono Vervet, *Saccharomyces cerevisiae* y monocitos de sangre periférica humana. Todas las muestras de ARN fueron adquiridas de una fuente comercial (Clontech, Palo Alto, CA), excepto las siguientes que fueron preparadas por la empresa: osteoblasto humano, línea celular de osteosarcoma humano, hueso humano, cartílago humano y hueso de mono Vervet. Estas muestras de ARN preparadas en la empresa fueron preparadas utilizando un estuche asequible comercialmente ("TRI Reagent", Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH).

La PCR fue realizada sobre estas muestras, y adicionalmente sobre una muestra genómica como control. El oligonucleótido Beer efector tenía la secuencia 5'-CCGGAGCTGGAGAACAACAAG-3' (SEC ID NO: 19). El cebador oligonucleotídico Beer antisentido tenía la secuencia 5'-GCACTGGCCGAGCACACC-3' (SEC ID NO: 20). Además, se realizó la PCR utilizando cebadores para el gen de la beta-actina humana, como control. El cebador oligonucleotídico de la beta-actina-efector tenía la secuencia 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGA CC-3' (SEC ID NO: 21). El cebador oligonucleotídico de la beta-actina antisentido tenía la secuencia 5'-GAAGT CCAGGGCGACGTAGCA-3' (SEC ID NO: 22). La PCR se realizó utilizando condiciones normalizadas en reacciones de 25 µl, con una temperatura de hibridación de 61 grados Celsius. Se llevaron a cabo 32 ciclos de PCR con los cebadores Beer y veinticuatro ciclos con los cebadores de la beta-actina.

Tras la amplificación, se analizaron 12 µl de cada reacción mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Ver Figura 2A.

B. *Hibridación In-situ de ARN de Secciones Embrionarias de Ratón*

El ADNc Beer de ratón completo (Secuencia de ID Núm: 11) fue clonado en el vector pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en las direcciones antisentido y efectora utilizando el protocolo del fabricante. Los transcritos efector y antisentido de ARNc marcado con S³⁵-alfa-GTP fueron sintetizados utilizando reactivos de transcripción *in vitro* suministrados por Ambion, Inc. (Austin, TX). La hibridación *in situ* fue realizada según los protocolos de Lyons y col. (*J. Cell Biol.* 111:2427-2436, 1990).

La sonda de ARNc Beer de ratón detectaba un mensaje específico expresado en el tubo neural, los blastemas, los vasos sanguíneos y los cartílagos de osificación de los embriones de ratón en desarrollo. El Panel A de la Figura 3 muestra expresión en la cresta ectodérmica apical (aer en sus siglas en inglés) del blastema (l en sus siglas en inglés), los vasos sanguíneos (bv en sus siglas en inglés) y el tubo neural (nt en sus siglas en inglés). El panel B muestra la expresión en el 4º ventrículo del cerebro (4). El Panel C muestra la expresión en la mandíbula (ma), en las vértebras cervicales (cv), el hueso occipital (oc), el paladar (pa) y los vasos sanguíneos (bv). El panel D muestra la expresión en las costillas (r) y en la válvula del corazón (va). El panel A es una sección transversal de embrión de 10,5 dpc. El panel B es una sección sagital de embrión de 12,5 dpc y los paneles C y D son secciones sagitales de embriones de 15,5 dpc.

Ba= arco branquial, h=corazón, te=telencéfalo (prosencéfalo), b=cerebro, f=masa frontal, g=intestino, j=mandíbula, li=hígado, lu=pulmón, ot=vesícula ótica, ao=, sc=médula espinal, skm=músculo esquelético, na=seno nasal, th=timo, to=lengua, fl=miembro anterior, di=diafragma.

Ejemplo 3

Expresión y purificación de proteína beer recombinante

A. *Expresión en células COS-1*

La secuencia de ADN que codifica la proteína Beer humana completa fue amplificada utilizando los siguientes cebadores oligonucleotídicos para PCR. El cebador oligonucleotídico 5' tenía la secuencia 5'-AAGCTTGGTACCATG

ES 2 272 093 T3

CAGCTCCCAC-3' (SEC ID NO: 23) y contenía un sitio para la enzima de restricción HindIII (en negrita) seguido de 19 nucleótidos del gen *Beer* empezando 6 pares de bases antes del presunto codón de iniciación amino terminal (ATG). El cebador oligonucleotídico 3' tenía la secuencia 5'-**AAGCTTCTACTTGTGCATCGTCGTCCTTG TAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCT**-3' (SEC ID NO: 24) y contenía un sitio para la enzima de restricción HindIII (en negrita) seguido de un codón de terminación complementario inverso (CTA) seguido del complemento inverso del epítipo FALG (subrayado, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) flanqueado por el complemento inverso de nucleótidos que codifican los 5 aminoácidos carboxi terminales de Beer. El producto de la PCR fue clonado con TA ("Original TA Cloning Kit", Invitrogen, Carlsbad, CA) y los clones individuales fueron rastreados mediante secuenciación del ADN. Un clon de secuencia verificada fue digerido después por HindIII y purificado sobre gel de agarosa al 1,5% utilizando reactivos asequibles comercialmente ("Qiaquick Gel Extraction Kit", Qiagen Inc., Valencia, CA). Este fragmento fue ligado después al plásmido pcDNA3.1 tratado con fosfatasa, digerido con HindIII y cultivado en placa sobre placas LB con 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias que portaban el recombinante deseado en la orientación apropiada fueron identificados mediante rastreo basado en PCR, utilizando un cebador 5' correspondiente al sitio promotor/cebador de T7 en pcDNA3.1 y un cebador 3' con la secuencia 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEC ID NO: 25) que corresponde al complemento inverso de la secuencia BEER interna. La secuencia del fragmento clonado fue confirmada mediante secuenciación del ADN.

Se utilizaron células COS-1 (ATCC #CRL-1650) para la transfección. Se transfectaron 50 µg del plásmido de expresión pcDNA-Beer-Flag utilizando un estuche asequible comercialmente siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante ("DEAE-Dextran Transfection Kit", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El medio final tras la transfección era DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) conteniendo Suero Bovino Fetal al 0,1%. Al cabo de 4 días de cultivo, el medio se separó. La expresión de BEER recombinante fue analizada mediante SDS-PAGE y Transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). La purificación de la proteína BEER recombinante se realizó utilizando una columna de afinidad M2 anti-FLAG ("Mammalian Transient Expression System", Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). El perfil de la columna fue analizado vía SDS-PAGE y Transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG.

B. Expresión en células de insecto SF9

La secuencia del gen *Beer* humano fue amplificada utilizando la PCR con condiciones normalizadas y los siguientes cebadores:

Cebador efector: 5'-GTCGTCCGGATCCATGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGAT-3' (SEC ID NO: 26)

Cebador antisentido: 5'-GTCGTCAAGCTTCTACTTGTGCATCGTCCTTGTAGTCTAGGC GTTCTCCAGCTCGGC-3' (SEC ID NO: 27)

El ADNc resultante contenía la región codificadora de Beer con dos modificaciones. La señal de secreción N-terminal se había eliminado y la etiqueta del epítipo FLAG (Sigma) estaba fusionada en marco con el extremo C-terminal del inserto. Se añadieron los sitios de clonación BamHI y HindIII y el gen fue subclonado en el vector pMelBac (Invitrogen) para la transferencia a un vector baculoviral utilizando métodos normalizados.

Los baculovirus recombinantes que expresaban la proteína Beer fueron elaborados utilizando el estuche de transfección Ba-N-blue (Invitrogen) y purificados según las instrucciones de los fabricantes.

Las células SF9 (Invitrogen) fueron mantenidas en medio TNM_FH (Invitrogen) conteniendo suero de ternera fetal al 10%. Para la expresión de la proteína, los cultivos de SF9 en matraces con extensor de centrifugación ("Spinner") a una MOI de más de 10. Las muestras de los medios y de las células fueron tomadas diariamente durante cinco días, y la expresión de Beer fue controlada mediante transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG (Sigma) o antisuero policlonal de conejo anti-Beer.

Al cabo de cinco días las células SF9 infectadas con baculovirus fueron recogidas mediante centrifugación y la proteína asociada a las células fue extraída del sedimento celular utilizando un tampón de extracción de elevada contenido de sal (NaCl 1,5 M, Tris 50 mM pH 7,5). El extracto (20 ml por 300 ml de cultivo) fue aclarado mediante centrifugación, sometido a diálisis tres veces frente a cuatro litros de solución salina tamponada con Tris (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7,5), y aclarado de nuevo mediante centrifugación. Esta fracción con elevado contenido de sal fue aplicada a Hitrap Heparin (Pharmacia: 5 ml de volumen de lecho), lavada extensamente con solución salina tamponada con HEPES (HEPES 25 mM 7,5, NaCl 150 mM) y las proteínas unidas se hicieron eluir con un gradiente de NaCl 150 mM a NaCl 1200 mM. La elución de Beer fue observada a un NaCl aproximadamente 800 mM. Las fracciones que contenían Beer fueron suplementadas con glicerol al 10% y DTT 1 mM y congeladas a -80°C.

ES 2 272 093 T3

Ejemplo 4

Preparación y ensayo de anticuerpos policlonales para Beer, Gremlin, y Dan

5 A. Preparación de antígeno

Las secuencias de ADN de Beer humana, Gremlin humana, y Dan humana fueron amplificadas utilizando métodos de PCR normalizados con los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

10

Beer H

Efector: 5'-GACTTGGATCCCAGGGGTGGCAGGCGTTC-3' (SEC ID NO: 28)

15

Antisentido: 5'-AGCATAAGCTTCTAGTAGGCGTTCTCCAG-3' (SEC ID NO: 29)

20

Gremlin H

Efector: 5'-GACTTGGATCCGAAGGGAAAAAGAAAGGG-3' (SEC ID NO: 30)

25

Antisentido: 5'-AGCATAAGCTTTTAATCCAAATCGATGGA-3' (SEC ID NO: 31)

30

Dan H

Efector: 5'-ACTACGAGCTCGGCCACCACCCATCAACAAG-3' (SEC ID NO: 32)

35

Antisentido: 5'-ACTTAGAAGCTTTCAGTCCTCAGCCCCCTTTCC-3' (SEC ID NO: 33)

40

En cada caso los cebadores enumerados amplificaban la región codificadora completa menos la secuencia señal de secreción. Entre estos se incluyen los sitios de restricción para la subclonación en el vector de expresión bacteriano pQE-30 (Qiagen Inc., Valencia) en los sitios BamHI/HindIII para Beer y Gremlin, y en los sitios SacI/HindIII para Dan. pQE30 contiene una secuencia codificadora para la etiqueta 6x His en el extremo 5' de la región de clonación. Los constructos completados fueron transformados en *E. coli* cepa M-15/pRep (Qiagen Inc.) y los clones individuales fueron verificados por secuenciación. La expresión de la proteína en M-15/pRep y la purificación (unión de la etiqueta de afinidad 6xHis a Ni-NTA acoplado con Sepharose) fueron realizadas como describen los fabricantes (Qiagen, The QIAexpressionist).

45

La proteína Beer derivada de *E. coli* fue recuperada en una cantidad significativa utilizando la solubilización en guanidina 6M y sometida a diálisis a 2-4M para evitar la precipitación durante el almacenamiento. Las proteínas Gremlin y Dan fueron recuperadas en una cantidad superior con solubilización en guanidina 6M y una concentración de guanidina post-purificación de 0,5M.

50

B. Producción y ensayo de anticuerpos policlonales

Se produjeron anticuerpos policlonales para cada uno de los tres antígenos en huéspedes como conejo y pollo utilizando los protocolos normalizados (R & R Antibody, Stanwood, WA; protocolo normalizado para inmunización de conejo y recuperación de antisuero; Short Protocols in Molecular Biology, 2ª edición, 1992. 11.37-11.41. Contributors Helen M. Cooper and Yvonne Paterson; el suero de pollo fue generado con Strategic Biosolutions Ramona, CA).

55

El antisuero de conejo y la fracción IgY de huevo de pollo fueron rastreados en cuanto a la actividad vía transferencia Western. Cada uno de los tres antígenos fue separado mediante PAGE y transferido a nitrocelulosa de 0,45 μ m (Novex, San Diego, CA). La membrana fue cortada en tiras conteniendo cada tira aproximadamente 75 ng de antígeno. Las tiras fueron bloqueadas en Blottig Grade Block al 3% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y lavadas 3 veces en 60 1X solución salina tamponada con Tris (TBS)/tampón Tween al 0,02%. El anticuerpo primario (tomas de sangre pre-inmunización, antisuero de conejo o IgY de huevo de pollo en diluciones que oscilaban de 1:100 a 1:10.000 en tampón de bloqueo) fue incubado con las tiras durante una hora con un balanceo suave. Una segunda serie de tres lavados 1X TBS/TWEEN al 0,02% estuvo seguida de una incubación de una hora con el anticuerpo secundario (anti-conejo de burro conjugado con peroxidasa, Amersham Life Science, Piscataway, NJ; o anti-pollo de burro conjugado con peroxidasa, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se realizó un ciclo final de 3X lavados de 1X TBS/TWEEN al 65 0,02% y las tiras fueron desarrolladas con Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

C. Ensayo de reactividad cruzada con anticuerpo

5 Siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior, se incubaron tiras de Beer, Gremlin o Dan con diluciones (1:5000 y 1:10.000) de sus respectivos antisueros de conejo o IgY de huevo de pollo así como antisuero o Igy de
 10 5 huevo de pollo (diluciones 1:1000 y 1:5000) elaborados para los dos antígenos restantes. Los niveles incrementados de anticuerpos que no se emparejaban fueron realizados para detectar la unión de baja afinidad por los anticuerpos que pueden ser observados solamente a una concentración elevada. El protocolo y la duración del desarrollo son los mismos para los tres eventos de unión utilizando el protocolo descrito antes. No se observaba reactividad cruzada con el antígeno para ninguno de los antígenos sometidos a ensayo.

Ejemplo 5

Interacción de Beer con proteínas de la superfamilia del TGF-beta

15 La interacción de Beer con las proteínas de diferentes ramas filogenéticas de la súper-familia del TGF- β fue estudiada utilizando métodos de inmunoprecipitación. Se obtuvieron TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 y GDNF a partir de fuentes comerciales (R & D systems; Minneapolis, MN). Un protocolo representativo es el siguiente. Se sometió a diálisis Beer parcialmente purificada en solución salina tamponada con HEPES (HEPES 25
 20 mM 7,5, NaCl 150 mM). Las inmunoprecipitaciones fueron realizadas en 300 μ l de tampón IP (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1,4 mM, triton X-100 al 0,5%, y glicerol al 10%). Se aplicaron 30 ng de proteína BMP-5 humana recombinante (R & D systems) a 15 μ l de matriz de afinidad FLAG (Sigma, St. Louis MO)) en presencia y ausencia de 500 ng de Beer marcada con el epítipo FLAG. Las proteínas fueron incubadas durante 4 horas @ 4°C y después las proteínas asociadas con la matriz de afinidad fueron lavadas cinco veces en tampón IP
 25 (1 ml por lavado). Las proteínas unidas se hicieron eluir de la matriz de afinidad en 60 microlitros de 1X tampón de muestra SDS PAGE. La proteínas fueron resueltas mediante SDS PAGE y la Beer asociada con BMP-5 fue detectada mediante transferencia Western utilizando antisuero anti-BMP-5 (Research Diagnostics, Inc.) (ver la Figura 5).

Análisis de Unión al Ligando BEER

30 La proteína FLAG-Beer (20 ng) es añadida a 100 μ l de PBS/BSA al 0,2% y adsorbida en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos previamente recubierta con anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Sigma; St Louis MO) y bloqueada con BSA en PBS al 10%. Esto se realiza a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Esta solución de proteína se separa y los pocillos se lavan para separar la proteína no unida. Se añade BMP-5 a cada pocillo a
 35 concentraciones que oscilan de 10 pM a 500 nM en PBS/BSA al 0,2% y se incuba durante 2 horas a la temperatura ambiente. La solución de unión se separa y la placa se lava tres veces con volúmenes de 200 μ l de PBS/BSA al 0,2%. Los niveles e BMP-5 son detectados utilizando anti-suero BMP-5 vía ELISA (F.M. Ausubel y col. (1998) Current Protocols in Mol. Biol. Vol. 2 11.2.1-11.2.22). La unión específica se calcula sustrayendo la unión no específica de la unión total y se analiza mediante el programa LIGAND (Munson y Podbard, Anal. Biochem., 107, pág. 220-239, (1980).
 40

En una variación de este método, se diseña Beer y se expresa como una proteína de fusión con Fc human. Del mismo modo el BMP ligando se diseña y se expresa como una fusión con Fc de ratón. Estas proteínas son incubadas
 45 juntas y el análisis es realizado como describe Mellor y col. utilizando la detección de fluorescencia de resolución con el tiempo (G.W. Mellor y col., *J. of Biomol Screening*, 3(2) 91-99, 1998).

Ejemplo 6

50 *Análisis de rastreo para la inhibición de la unión de la proteína de unión a TGF-beta a miembros de la familia del TGF-beta*

El análisis descrito antes se repite con dos excepciones. Primero, la concentración de BMP se mantiene fija a la Kd determinada previamente. Segundo, se añade una colección de candidatos antagonistas a una concentración fijada (20
 55 μ M en el caso de las colecciones de moléculas orgánicas pequeñas y 1 μ M en estudios con anticuerpo). Entre estas moléculas candidato (antagonistas) de la unión a la proteína de unión de TGF-beta se incluyen compuestos orgánicos derivados de colecciones comerciales o internas que representan diversas estructuras químicas. Estos compuestos son preparados en forma de soluciones de partida en DMSO y son añadidas a pocillos de análisis a \leq 1% del volumen final en condiciones de análisis normalizadas. Estas son incubadas durante 2 horas a la temperatura ambiente con BMP y
 60 Beer, la solución es separada y el BMP unido es cuantificado como se ha descrito. Los agentes que inhiben el 40% de la unión a BMP observada en ausencia de compuesto o anticuerpo son considerados antagonistas de esta interacción. Estos son evaluados adicionalmente como inhibidores potenciales basándose en estudios de titulación para determinar sus constantes d inhibición y su influencia sobre la afinidad de unión de la proteína de unión a TGF-beta. Asimismo se pueden llevar a cabo análisis de control de la especificidad comparables para establecer el perfil de selectividad para el
 65 antagonista identificado a través de estudios en los que se utilizan análisis dependientes de la acción del ligando BMP (v.g., estudio de competición BMP/receptor de BMP).

ES 2 272 093 T3

Ejemplo 7

Inhibición de la localización de la proteína de unión a TGF-beta a la matriz del hueso

5 La evaluación de la inhibición de la localización en la matriz del hueso (hidroxiapatita) se realiza utilizando modificaciones del método de Nicolás (Nicolás, V. Calcif Tissue Int. 57:206, 1995). Brevemente, la proteína de unión a TGF-beta marcada con I¹²⁵ es preparada como describe Nicolás (*supra*). La hidroxiapatita es añadida a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos equipada con una membrana de filtración de polipropileno (Polyfiltronic, Weymouth MA). La proteína de unión a TGF-beta es añadida a albúmina al 0,2% en tampón PBS. Los pocillos que
10 contienen la matriz son lavados 3 veces con este tampón. La proteína de unión a TGF-beta adsorbida se hace eluir utilizando NaOH 0,3M y se cuantifica.

La identificación del inhibidor se lleva a cabo por medio de la incubación de la proteína de unión a TGF-beta con moléculas de ensayo y aplicando la mezcla a la matriz como se ha descrito antes. La matriz se lava 3 veces con albúmina al 0,2% en tampón PBS. La proteína de unión a TGF-beta adsorbida se hace eluir utilizando NaOH 0,3M y se cuantifica. Los agentes que inhiben el 40% de la unión de la proteína de unión a TGF-beta observada en ausencia de compuesto o anticuerpo son considerados inhibidores de la localización ósea. Estos inhibidores se caracterizan adicionalmente por los estudios dosis-respuesta para determinar sus constantes de inhibición y su influencia sobre la afinidad de unión de la proteína de unión a TGF-beta.
20

Ejemplo 8

Construcción de mutantes de la proteína de unión a TGF-beta

25 A. Mutagénesis

Un ADNc de la proteína de unión a TGF-beta completo en pBluescript SK sirve como molde para la mutagénesis. En resumen, los cebadores apropiados (ver el estudio proporcionado aquí) son utilizados para generar el fragmento de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando la polimerasa Vent DNA (New England Biolabs, Beverly, MA). La reacción en cadena de la polimerasa se hace funcionar durante 23 ciclos en tampones proporcionados por el fabricante utilizando una temperatura de hibridación de 57°C. El producto es expuesto después a dos enzimas de restricción y tras el aislamiento utilizando electroforesis en gel de agarosa, ligado de nuevo en pRBP4-503 del cual se ha separado la secuencia de emparejamiento mediante digestión enzimática. La integridad del mutante es verificada mediante secuenciación del ADN.
35

B. Expresión en Células de Mamífero y Aislamiento de la Proteína de unión a TGF-beta mutante

Los ADNc de la proteína de unión a TGF-beta mutante son transferidos al vector de expresión de mamífero pcDNA3.1 descrito en el Ejemplo 3. Después de verificar la secuencia, los constructos resultantes son transfectados en células COS-1, y la proteína secretada es purificada como se describe en el Ejemplo 3.
40

Ejemplo 9

45 *Modelos animales-I*

Generación de ratones transgénicos que sobreexpresan el gen Beer

50 El clon BAC de ~200 kilobases (kb) 15G5, aislado de la genoteca de ADN genómico de ratón CTIB (distribuido por Research Genetics, Huntsville, AL) fue utilizado para determinar la secuencia completa del gen Beer de ratón y sus regiones limítrofes 5' y 3'. Un fragmento Sall de 41 kb, conteniendo el cuerpo del gen completo, más ~17 kb de la secuencia limítrofe 5' y ~20 kb de la secuencia limítrofe 3' fue subclonado en el sitio BamHI del vector cosmídico SuperCos1 (Stratagene, La Jolla, CA) y propagado en la cepa DH101B de *E. coli*. De este constructo cosmídico, un fragmento de restricción MluI-AvIII de 35 kb (Secuencia Núm. 6), incluyendo el gen Beer de ratón completo, así como la secuencia limítrofe de 17 kb y de 14 kb 5' y 3', respectivamente, fue purificado después en gel, utilizando medios convencionales, y utilizado para la microinyección en cigotos de ratón (DNX Transgenics; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.873.191). Los animales fundadores en los que el fragmento de ADN clonado había sido integrado al azar en el genoma fueron obtenidos a una frecuencia del 5-30% de las crías que nacen vivas. La presencia del transgen fue determinada realizando el análisis de transferencia Southern del ADN genómico extraído de una pequeña cantidad de tejido de ratón, tal como la punta de una cola. El ADN fue extraído utilizando el siguiente protocolo: el tejido fue digerido durante la noche a 55°C en tampón de lisis conteniendo NaCl 200 mM, Tris 100 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS al 0,2% y 0,5 mg/ml de Proteinasa K. Al día siguiente, el ADN fue extraído una vez con fenol/cloroformo (50:50), una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y precipitado con etanol. Tras la re-suspensión en TE (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1,5 mM), 8-10 µg de cada muestra de ADN fueron digeridos con una endonucleasa de restricción, tal como EcoRI, sometidos a electroforesis en gel y transferidos a una membrana de nailon cargada, tal como HybondN+ (Amersham, Arlington Heights, IL). El filtro resultante fue hibridado después con un fragmento marcado radiactivamente de ADN derivado del locus del gen *Beer* de ratón, y susceptible de reconocer tanto un
65

fragmento del locus del gen endógeno como un fragmento de un tamaño diferente derivado del transgen. Los animales fundadores fueron criados hasta ratones no transgénicos normales para generar un número suficiente de progenie transgénica y no transgénica en la cual determinar los efectos de la sobre-expresión del gen *Beer*. Para estos estudios, animales de diversas edades (por ejemplo, 1, día, 3 semanas, 6 semanas, 4 meses) son sometidos a numerosos análisis diferentes diseñados para averiguar la formación esquelética gruesa, la densidad mineral del hueso, el contenido mineral del hueso, la actividad de osteoclastos y osteoblastos, el grado de osificación endocondral, la formación de cartilago, etc. La actividad transcripcional del transgen puede ser determinada extrayendo el ARN de diversos tejidos, y utilizando un análisis de RT-PCR que obtenga ventaja de los polimorfismos de nucleótidos individuales entre la cepa de ratón de la cual deriva el transgen (129Sv/J) y la cepa de ratones utilizada para la microinyección de ADN [(C57BL5/J x SJL/J)F2].

Modelos animales II

Desorganización del gen Beer de ratón mediante recombinación homóloga

La recombinación homóloga en células madre (ES) embrionarias puede ser utilizada para inactivar el gen *Beer* endógeno de ratón y generar con posterioridad animales que porten la mutación con pérdida de función. Un gen informador, tal como el gen de la β -galactosidasa de *E. coli*, fue diseñado en el vector de redireccionamiento de manera que su expresión estuviera controlada por el promotor del gen *Beer* endógeno y la señal de iniciación de la traducción. De este modo, los patrones espaciales y temporales de la expresión del gen *Beer* pueden ser determinados en animales que portan un alelo redireccionado.

El vector redireccionado fue construido clonando primero la casete del gen *resistente a la neomicina (neo)* dirigido por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) seleccionable por fármaco de pGT-N29 (New England Biolabs, Beverly, MA) en el vector de clonación pSP72 (Promega, Madison, WI). Se utilizó la PCR para flanquear la casete PGKneo con sitios P1 loxP de bacteriófago, que son los sitios de reconocimiento para la recombinasa P1 Cre (Hoess y col., PNAS USA, 79:3398,1982). Esto permite la posterior eliminación del marcador de resistencia a neo en las células ES redireccionadas en animales derivados de células ES (Patente de los Estados Unidos 4.959.317). Los cebadores de la PCR estaban comprendidos por una secuencia de 34 nucleótidos (ntd) loxP, 15-25 ntd complementarios a los extremos 5' y 3' de la casete PGKneo, así como sitios para el reconocimiento por la enzima de restricción (BamHI en el cebador efector y EcoRI en el cebador anti-sentido) para la clonación en pSP72. La secuencia del cebador efector era 5'-AATCTGGATCCATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATCTG CAGGA TTCGAGGGGCCCT-3' (SEC ID NO: 34); la secuencia del cebador anti-sentido era 5'-AATCTGAATTC CACCGGTGTTAATTAATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTAGAG TCAGCTTCTGA-3' (SEC ID NO: 35).

La siguiente etapa fue clonar un fragmento de XhoI-HindIII de 3,6 kb, conteniendo el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* y la señal de poliadenilación de SV40 de pSV β (Clontech, Palo Alto, CA) en el plásmido pSP72-PGKneo. El "brazo corto" de la homología del locus del gen *Beer* de ratón fue generado amplificando un fragmento del clon BAC 15G5. El extremo 3' del fragmento coincidía con el sitio de inicio de la traducción del gen *Beer*, y el cebador anti-sentido utilizado en la PCR también incluía 30 ntd complementarios al extremo 5' del gen de la β -galactosidasa de manera que su región codificadora pudiera ser fusionada con el sitio de iniciación de *Beer* en marco. El enfoque escogido para introducir el "brazo corto" en el plásmido pSP72- β gal-PGKneo fue linealizar el plásmido en un sitio aguas arriba del gen β -gal y después co-transformar este fragmento con el producto de la PCR del "brazo corto" y seleccionar los plásmidos en los cuales estaba integrado el producto de la PCR mediante recombinación homóloga. El cebador efector para la amplificación del "brazo corto" incluía 30 ntd complementarios al vector pSP72 para permitir este evento de recombinación. La secuencia del cebador efector era 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGTCCGA GCAGCTGAAGCTTAACCACATGGTGGCTCACAACCAT-3' (SEC ID NO: 36) y la secuencia del cebador anti-sentido era 5'-AACGACGGCCAGTGAATCCGTA ATCATGGTCATGCTGCCAGGTGGAGGAGGGCA-3' (SEC ID NO: 37).

El "brazo largo" del locus del gen *Beer* fue generado amplificando un fragmento de 6,1 kb del clon BAC 15G5 con cebadores que también introducían los sitios para las enzimas de restricción de corte poco común ("rare-cutting") SgrAI, FseI, AseI y PacI. Específicamente, la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACCACCGGTGA CACCC GCTTCCTGACAG-3' (SEC ID NO: 38); la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACTTAATTAATA CATGGCGCGCCATATGGCC GGCCCTAATTGCGGCGCATCGTTAATT-3' (SEC ID NO: 39). El producto de la PCR resultante fue clonado en el vector TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) como una etapa intermedia.

El constructo dirigible al gen *Beer* de ratón también incluía un segundo marcador seleccionable, el gen de la *ti-midina quinasa del virus herpes simplex 1* (HSVTK) bajo el control del elemento de la larga repetición terminal del virus del sarcoma de Rous (RSV LTR). La expresión de este gen vuelve las células de mamífero sensibles (e inviábiles) al ganciclovir, es por lo tanto un modo conveniente de seleccionar frente a células resistentes a la neomicina en las cuales ha sido integrado el constructo mediante un evento no homólogo (Patente de los Estados Unidos 5.464.764). La casete RSVLTR-HSVTK fue amplificada de pSP1337 utilizando los cebadores que permiten la posterior clonación en los sitios FseI y AseI del "brazo largo"-plásmido vector TA. Para esta PCR, la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACGGCCGCGCAAAGG AATTCAGA TCTGA-3' (SEC ID NO: 40); la secuencia del cebador antisentido era 5'-ATTACGGCGCGCCCTCACAGGCCGACCC AGCT-3' (SEC ID NO: 41).

La etapa final en la construcción del vector redireccionado implicaba la clonación del fragmento SgrI-AscI de 8,8 kb que contenía el “brazo largo” y el gen RSVLTR-HSVTK en los sitios SgrAI y AscI del plásmido pSP72-“brazo corto”- β gal-PGK neo. Este vector redireccionado fue linealizado mediante digestión o bien con AscI o PacI antes de la electroporación en células ES.

5

Ejemplo 10

Inactivación de Beer mediada por antisentido

10

Se preparan oligonucleótidos antisentido de 17 nucleótidos en un formato solapante, de tal manera que el extremo 5' del primer oligonucleótido se solape con el AUG de inicio de la traducción del transcrito Beer, y los extremos 5' de los sucesivos oligonucleótidos se produzcan en incrementos de 5 nucleótidos moviéndose en dirección 5' (hasta 50 nucleótidos más allá), en relación con el AUG de Beer. Se diseñan los correspondientes oligonucleótidos de control y se preparan utilizando composiciones de bases equivalentes pero redistribuidas en la secuencia para inhibir cualquier hibridación significativa para el ARNm codificador. La liberación del reactivo para el sistema de ensayo celular se lleva a cabo a través de un reparto de lípidos catiónicos (P.L. Felgner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413, 1987). Se añaden 2 μ g de oligonucleótido antisentido a 100 μ l de medio con el suero reducido (medio con suero reducido Opti-MEM 1; Life Technologies Gaithersburg MD) y este se mezcla con reactivo Lipofectin (6 μ l) (Life Technologies, Gaithersburg MD) en los 100 μ l de medio con suero reducido. Estos se mezclan, se permite que formen complejos durante 30 minutos a la temperatura ambiente y la mezcla se añade a células MC3T3E21 o KS483 sembradas previamente. Estas células se cultivan y el ARNm se recupera. El ARNm de Beer se controla utilizando RT-PCR junto con cebadores específicos de Beer. Además, se recogen los pocillos experimentales separados y los niveles de proteína se caracterizan por medio de métodos de transferencia western descritos en el Ejemplo 4. Las células son cosechadas, resuspendidas en tampón de lisis (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, SDS al 1%) y la proteína soluble se recoge. Este material se aplica a SDS PAGE en un gradiente desnaturalizante al 10=20). Las proteínas separadas son transferidas a nitrocelulosa y la transferencia western es realizada como antes utilizando los reactivos anticuerpo descritos. Paralelamente, se añaden los oligonucleótidos de control a cultivos idénticos y se repiten las condiciones experimentales. El descenso en los niveles de ARNm o proteína Beer se considera significativo si el tratamiento con el oligonucleótido antisentido da como resultado un cambio del 50% en cualquier caso comparado con el oligonucleótido con las mismas bases orientadas de manera azarosa (“scrambled”) de control. Esta metodología permite la inactivación selectiva del gen y la posterior caracterización del fenotipo de los nódulos mineralizados en el modelo de cultivo de tejidos.

35

(Secuencia pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 272 093 T3

SECUENCIAS

SEQ ID NO. 1: ADNc de BEER Humano (región codificadora completa más UTR 5' y 3')

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

TGAAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC
 CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGTGGCAGGCGTTCAAGATGATGCCACGGAAATCATCC
 CGAGCTCGGAGTGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAACAGACCATTGAACCGGGCGAGAGACGGAGGGCGGC
 CTCCCCACACCCCTTTGAGACCAAGAGCGTGTCCGAGTACAGCTGCCCGAGCTGCACCTTCAACCGCTACGTGACCGAT
 GGGCGTGGCGCAGCGCAAGCGGTACCGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGGGGCCGGCGGCTGCTGCCAACGC
 CATCGGCGCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTCCGCTGCATCCCGAGCGCTACCGCGCGCAAGCGGTGC
 AGCTGCTGTGTCCCGTGGTGGGGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGTTGGCCTGTCGAAGTGCAGAGCGCCTCACC
 CGCTTCCACAGCACTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGCGCGCTCGGCCGAGAGGGCCGGAGCGCGCGCGCG
 CGCGCGGAGCGCAAGCCAAAGCCAGCGGAGCTGGAGAACCGCTACTAGAGCCCGCGCGCGCGCTCCCGCGCGCGCG
 GCGCGCGCGCTGACCGCGCGCGCGCAATTTCTGCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTTCAATTTGTAATGCGCTGC
 AACCCAGGGCGAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGCGCAAGCGCGCGCTCAGCGCGCGAGCTG
 AGGGGTCCACCGGGCAGGGGAGGGAAATTGAGAGTACAGACACTGAGCCACGCAGCGCGCGCTCTGGGGCGCGCTACCT
 TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTCAAGCGCGCGCGCAAGCGCGCGCTCAGCGCGCGAGCTG
 GAAAGTCCAGGGTCTGGTTAAGAAAGTTGGATAGATTCCCCCTTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
 CCAGAGCACAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTTGCACCTACTTGTGTGTGTAACCTTGAAC
 TACACATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
 TGGCATATGATTCCAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGAAATG
 CAGTTGCATTGATTCAAGTCCAGGTCAGTCACTTCCAGAAATCAGAGTTGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAPDA
 CAACAGAAAFAAAAAGTAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAGAGACTATGCTG
 CTTCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATACATCATCCATTGGGGTAGA
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCAACTTCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG
 ACCCATAGCCATGTTTTAAGTCACTTCCGAGAGAAAGTAAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCCGAGGGAGC
 AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTGAGACACCGCCTTCTGCCACCCTCACGGACACATTTCTGCT
 AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATTGGGGGAAAACTACAAGT
 GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAAATCTTTTGAATAATCATTCCAGACACCTC
 TTAATTTCTGTGTAGTTTTAATGTTAAAAAAGTTTAAACAGAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
 GGTGTTTTTTGGCAATCTTCCAGTGGGACTTGTCCACAAGAATGAAAGTAGTGGTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTTGTAGAGAAAGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
 CAGTCTGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGATCATGACCGAAAG

SEQ ID NO. 2: Proteína BEER Humana (secuencia completa)

60
 65

MQLFLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATEIIFELSEYEEFFPELENNKTMNRAENGGREFHHEFETHDVSEYSC
 RELHFTRYVTDGFCRSAPVTELVCSGQCGFARLLFNAIGRGKWWRFSGDFRCIPDRYRAQRVQLLCEGGEAERARKVR
 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARFQKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

ES 2 272 093 T3

SEQ ID NO. 3: Proteína BEER Humana conteniendo mutación terminadora de Esclerosteosis

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCTCCTCTGGCTGGTACCAATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCTAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCC
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAAACAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC
CTCCCCACCAACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTACCCCGCTACGTGACCGAT
GGGCCGTGCCGACGGCCAAAGCCGCTCACCGAGCTGTTGTGCTCCGGCCAGTGCGGCCCGGGCGCCTGCTGCCCAACGC
CATCGCCCGCGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC
AUCTGTGTGTCCCGTGGTGGAGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGGCGCTGTTGGCTCGTGCAAGTGCAAGCGCTCACC
CGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCCGGACCGAGGCGCTCGCCCGCAGAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCAAGGCCAACAGGCCGAGCTGGAGAACGCCCTACTAGAGCCCGCCCGCCCTCCCCACCGCGCGGC
GCCCCGGCCCTGAACCGCGCCCACTTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTCAATTGTAATGCCTGC
AACCCAGGGCAAGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGFTCCCAAGGGCCAGGGGAGGGATTGAGAGTCAAGACACTGAGCCACCGAGCCCGCCTCTGGGGCCGCTACCT
TTGCTGGTCCCACTTCAAGAGGCGCAAAATGGAAGCATTTTACCGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAACTTGTGTGTAACCTTGAAC
TACACAATTTCTCTTCCGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGAATG
CAGTTGCATTGATTCAAGTCCAAAGGTCACTTCCAGAATTCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA
CAACAGAAAPAAAAGTAAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAAACTCCTGGAGAGCTATGCTG
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGATAGAAATCACATCCGCCCACTTCCCAAGAGCAGCATCCCTCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAGTCACTTCCGAAGAGAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCCGAGGGAGC
AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTGAGACACCGCCTTCTGCCACCACTCACGGACACATTTCTGCCT
AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATTGGGGGAAAACTACAAGT
GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTTGAATAATCATTTCCAGACACCTC
TTACTTCTGTGTAGTTTTTAAATTTGTTAAAAPAAAAGTTTTTAAACAGAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
GGTGGTTTTTTTGGCAATTTCTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAATGAAAGTGTGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAGTTTTTCTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
CAGTCTGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTTGTTAATAAGACAAATGAAATCATGACCGAAG

SEQ ID NO. 4: Proteína BEER Humana Truncada de Esclerosteosis

60 MQLFLALCLVCLLVHTAFRWEG*

65

ES 2 272 093 T3

SEQ ID NO. 5: ADNc de BEER Humano que codifica la Variante de la Proteína (V10I)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCTCCTCTGGGTGGTACCATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCTCATCTGC
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAAATGATGCCACGGAAATCATCCG
CGAGCTGGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGGGC
CTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACCTTACCCCGCTACGTGACCGAT
GGGCCGTGCCGACGCCAAGCCGGTCAACCGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGGGGCCGGCGCGCTGCTGCCCAAGGC
CATCGGCCGCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC
AGCTGCTGTGTCCCGTGGTGGGGCGCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGGTGGCCTCGTSCAAGTGCAGCGCCTCACCC
CGCTTCCACAAACAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCGAGAAAGGGCCGGAAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCAAGCCAAACAGGCGAGCTGGAGAAGCGCTACTAGAGCCCGCCGCGCCCTCCCCACCGCGCGGC
GCCCGGCCCTGAACCCGCGCCCACTTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTATTGTTTATATTTTATTGTAATGCCTGC
AACCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCGGGGCGCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTCAACAGACTGAGCCACGCAGCCCGCCTCTGGGGCCGCTACCT
TTGCTGGTCCCCTTACAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTCCCGCCCTGGGGTTTTAAGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTTGCCACTAATTGCTGTGTAACCTTGAAC
TACACAATTTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAATGAATG
CAGTTGCATTGATTAGTGCACAGGTCACTTCCAGAAATCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA
CAAAACAGAAAAAAGTAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTG
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCAACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACTTCCGAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGACAGCCCCGAGGGAGC
AGCCATCACAACTCAACAGACAGCAGCATCCCTTTGAGACACCGCTTCTGCCACCCTCAGGGACACATTTCTGCCT
AGAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATACTTACACTAAAAGAAATATATTGGGGGAAAAACTACAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAATCTTTTGAATCATTTCCAGACAACTC
TTACTTTCTGTGTGTTTTTAATTTGTAABAAAAAAGTTTTAAACAGAAAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
GGTCGTTTTTTGGCAATTCTCCAGTGGGACTGTCCACAAGAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACT
ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTTGTAGAGAAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
CAGTCTGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAGACAATGAATCATGACCGAAG

SEQ ID NO. 6: Variante de la Proteína BEER Humana (V10I)

60
65

LVASCKCKRLTRFHHQSELKDFGTEAARFQNGRKFREFRARSAAKAAQAELENAF

ES 2 272 093 T3

SEQ ID NO. 7: ADNc Beer Humano que codifica la Proteína Variante (P38R)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

AGAGCCTGTGCTACTGSAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAGAAATGATGCCACGGAAATCATCCG
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC
CTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGAT
GGGCCGTGCCCGAGCGCAAGCCGGTACCGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGGGGCCCGCGCGCTGCTGCCCAACGC
CATCGGCCGCGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC
AGCTGTGTGTCCCGTGGTGGGCGCCCGCGCGCGCAAGGTGGCCCTGGTGGCTCGTGCAGTGCAGCGCCTCACC
CGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCCGGACCGAGGCCGCTCGGCCGAGAAAGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCAAGGCCAACAGGCCGAGCTGGAGAACGCCTACTAGAGCCCGCCCGCGCCCTCCCCACCGGGCGGC
GCCCCGGCCCTGAACCCGCGCCCCACATTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTTATTTTATTGTAAATGCCTGC
AACCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAAATCCCGGGCGCGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTACAGACACTGAGCCACGCAGCCCGCCTCTGGGGCCGCTACCT
TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGAGAAATGGAAAGCATTTTACCAGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTTCCCTTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAACTTGCTGTGTAACCTTGAAC
TACACAATTTCTCTTCCGGACCTCAATTTCCACTTTGTAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAATGAATG
35
40
45
50
55

CAGTTGCATTGATTGAGTGCACAGGCTCACTTCCAGAAATCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA
CAAAACAGAAAAAAGTAAAGTCTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAAACTCTGGAAGAAGCTATGCTG
CTTCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGATAGAAATCACATCGGCCCAACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCTCCTTCCGAGAGAAGTGAAGGTTCCAGGCACTGGCCTTGAGGGCCCGAGGGAGC
AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCAGATCCCTTTGAGACACCGCCTTCTGCCACCCTCAGGGACACATTTCTGCCT
AGAAAACAGCTTCTACTGCTCTTACATGTGATGGCTATCTTACACTAAAGAAATATTATTGGGGAAAAACTACAAGT
GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCAGCAAAAATCTTTTTGAAATCATTCCAGACAACCTC
TTACTTTCTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAAGTTTAAACAGAGGCACATGACATATGAAGCCTGCAGGACT
GGTCGTTTTTTGGCAATTTCTCCAGTGGGACTTGTCCACAGAAATGAAGTASGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTTGTAGAGAAATGACAAATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

SEQ ID NO. 8: Variante de la Proteína BEER Humana (P38R)

60
65

MQFLALCLVCLLVHTAFRVVGGQWQAFKNDATFI IRELGEYFEFFFELENNKTMNRAENGGRFHHF FETKDYSEYSC
RELHFTRYVTDGFCRSAKEVTELVCSGQCFARLLEHAIIGRKKWRFSGFDRCIFDRYRAQRVQLLCEGGEAFRARKVR
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEEARFPQGRKFRFRARSAKANQBELENAY

ES 2 272 093 T3

SEQ ID NO. 9: ADNc de BEER de Vervet (región codificadora completa)

5 ATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTGTCTGCTGCTGGTACACGCAGCCTTCGGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCA
 GGCCCTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCCCGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAAACA
 AGACCATGAACCGGGCGGAGAAATGGAGGGCGGCCTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGC
 10 CGAGAGCTGCACTTCAACCGCTACGTGACCGAAGGGCCGTGCCGACGGCCAAGCCAGTACCGAGTTGGTGTGCTCCGG
 CCAGTGGGGCCCGCACGCCTGCTGCCAACGCCATCGGCCGGCAAGTGGTGGCGCCGAGTGGGCCCGACTTCCGCT
 GCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAAGCGTGTGCAAGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGGCGCGCCGCGCGCGCAAGGTGCGC
 15 CTGGTGGCCTCGTGAAGTGAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAGTGGAGCTCAAGGACTTCGGTCCCGAGGCCCG
 TCGGCCGCAAGAAGGGCCGGAAGCCGCGCCCCGCGCCCCGGGGGCCAAGCCCAATCAGGCCGAGCTGGAGAAGCCCTACT
 AG

SEQ ID NO. 10: Proteína BEER de Vervet (secuencia codificadora completa)

25 MQLFLALCLVCLLVHAAFRVVEGGQWQAFKNDATETIIFELGEYFEFFFELENNKTMNRAENGGREFHHEFETKDVSEYSC
 RELHFTRYVTDGFCRSKAFVTELVSGQCGFARLLFNALGRVKWRRFSEDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGAAPRSRKRVLV
 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGFETARFQKGRKPRFRARGAKANQAELENAY

SEQ ID NO. 11: ADNc de BEER de Ratón (región codificadora completa)

35 ATGCAGCCCTCACTAGCCCGGTGCTCATCTGCCTACTTGTGCACGCTTCCTTCTGTCTGTGGAGGGCCAGGGGTGGCA
 AGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTATCCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAACACCCAGACCA
 TGAACCGGGCGGAGAAATGGAGGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAGGTTGTGTCGAGTACAGCTGCCCGAG
 40 CTGCACTACACCCGCTTCCCTGACAGACGGCCCATGCCGCAAGGCCAAGCGGTCACCGAGTTGTTGTGCTCCGGCCASTG
 CGGCCCGCGCGGCTGCTGCCAAGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAACGGACCGGATTTCCGCTGCATCC
 CGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGGCGCGCGCCGCGCTCGGCCAAGGTTCGCTGTGGTG
 45 GCCTCGTGAAGTGAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAGTGGAGCTCAAGGACTTCGGGCCGGAGACCGCGCGGCC
 GCAGAAGGGTCGCAAGCCGCGGCCCGGGCGCCCCGGGAGCCAAAGCCAACCCAGGCGGAGCTGGAGAACCGCTACTAGAG

SEQ ID NO. 12: Proteína BEER de Ratón (secuencia completa)

50 MQLSLAFCLICLLVHAAFCAVEGGQWQAFRNDATETIIFELGEYFEFFFEENNQTMNRAENGGREFHHEFYDAKDVSEYSCRE
 LHYTRFLTLDGFCRSKAFVTELVCSGQCGFARLLFNALGRVKWRRFNGEDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGAAPRSRKRVLV
 55 ASCKCKRLTRFHNQSELKDFGFETARFQKGRKPRFRARGAKANQAELENAY

ES 2 272 093 T3

SEQ ID NO. 13: ADNc de BEER de Rata (región codificadora completa más UTR 5')

5 GAGGACCGAGTGCCCTTCCTCCTTCTGGCACCATGCAGCTCTCACTAGCCCTTGCCTTGCCTGCCTGCTTGTACATGCA
GCCTTCGTGCTGTGGAGAGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAAGAATGATGCCACAGAAATCATCCCGGGACTCAGAGAGTA
CCCAGAGCCTCCTCAGGAAGTACAGAAACAACCAGACCATGACCGGGCCGAGAACGGAGGCAGACCCCCACCATCCTT
10 ATGACACCAAGACGCTGTCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCGTGACCGACGGCCCGTGCCGAGT
GCCAAGCCGGTACCGAGTTGGTGTGCTCGGGCCAGTGGGGCCCGCGGGCTGCTGCCCAAGCCATCGGGCCGCTGAA
GTGGTGGCGCCGAAACGGACCCGACTTCGGCTGCATCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCG
15 GCGGCGCGCGCCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCTCGTGCAAGTGAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCCAG
TCGGAGCTCAAGGACTTCGGACCTGAGACCGCGCGCCGCGAGAGGGTGGCAAGCCGCGCCCGCGCCCGGGGAAGCA
AGCCAACAGGGCGGAGCTGGAGAAGCCCTACTAG

SEQ ID NO. 14: Proteína BEER de Rata (secuencia completa)

25 MQLSLAFCLACLIVHAAAFVAVESQSWQAFKHDATETIIFGLREYEEFFQELNHTMIIRAENGGRFPHHEYDTRDYSEYFQ
RELHYTRFVTDGFCRSAPKVTTELVCSSGQCGEARLLFNIAIGRVKWWREHSGDFRCIEDRYRAQRVQLLCEGGAAERERERVA
30 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGPEEARFRQGRKRFERARGAKAIQAELENAF

SEQ ID NO. 15: ADNc de BEER Bovina (región codificadora parcial)

35 AATAATGATAGCAGAGAAATCATCCCGAGCTGGGCGAGTACCCCGAGCCTCTGCCAGAGCTGAACAACAGACCATGAAC
CGAATGAAATAGCGAGGAGACCTCCCACCACCCCTTTGAGACCAAGACCGCTCCGAGTACAGCTGCCGGGAGCTGCA
40 ATTCAAGCCCTACGTGACCGATGGCCGTGCCGACAGCGCAAGCCGGTCAACGAGCTGGTGTGCTCGGGCCAGTGGGGC
CGATGAGCCCTGCTGCCAAGCCATCGGCCGCGCAAGTGGTGGCGCCCAAGCGGGCCGACTTCGGCTGCATCCCGAC
45 GCTAGCGCGGAGCGGGTGCAGCTGTTGTGTCTCTGGCGGGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGCGCTGGTGGCTC
GTGAAAGTGTAGCCGCTCACTCGCTTCCACAACCAAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGCCCGAGGCCGCGGGCCGAAA
CGAGCGGAAAGCTGCGGCCCGCGCCCGGGGCACCAAGCCAGCCGGGCGA

SEQ ID NO. 16: Proteína BEER Bovina (secuencia parcial -- secuencia señal perdida y últimos 6 restos)

50 HDATETIIFELGEYEEFLPELNHTMIRAENGGRFPHHFETKDASEYSCRELHETRYVTDGFCRSAPKVTTELVCSSGQCGE
55 ARLLFNIAIGRVKWWREHSGDFRCIEDRYRAQRVQLLCEGGAAFRARKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGPEEARFRQ
GRKLRERARGTKASKA

ES 2 272 093 T3

SEQ ID NO. 17: Fragmento de Restricción MII-AvIII utilizado para elaborar transgen de Beer de ratón

5 CGCGTTTTGGTGAGCAGCAATATTGCGCTTCGATGAGCCTTGGCGTTGAGATTGATACCTCTGCTGCACAAAAGGCAATC
GACCGAGCTGGACCAGCGCATTGCTGACACCGTCTCCTTGGAACTTATTCSCAATGGAGTGTCAATTCATCAAGGACNGCC
10 TGATCGCAATGGTGTATCCACGCAGCGGCATCGAAAACCCCTCAGCCGGTGACCAATATCTACAACATCAGCCTTGGT
ATCCTGCGTGATGAGCCAGCGCAGAACAGGTAAACCGTCACTGCCGATAAGTTCAAAGTTAAACCTGGTGTGATACCAA
15 CATTGAAAACGTTGATCGAAAACCGCTGAAAACCGTGTGAATGTGCGCGCTGGATGTCACAAGCAATGGCAGCAG
ACAAGAAAGCGATGGATGAACCTGGCTTCTATGTCCGCACGGCCATCATGATGGAATGTTCCCGGTGGTGTATCTGG
CAGCAGTGCCGTCGATAGTATGCAATTGATAATTATATCATTTGGGGGTCCTTTCCGGCGATCCGCCCTGTTACGGGGC
20 GCGGACCTCGCGGGTTTTCGCTATTTATGAAAATTTCCGGTTTAAGGCTTTCCGTTCTTCTTCTGTCATACTTAATGT
TTTTATTTAAAATACCCCTCTGAAAAGAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAAGCGAGCTTTTTGGCCTCTGTGTTTTCTTTC
TCTGTTTTTGTCCGTGGATGAACAATGGAAGTCAACAAAAGCAGAGCTTATCGATGATAAGCGGTCAACATGAGAAAT
25 TCGCGGCGCATAATACGACTCACTATAGGGATCGAAGCCTACTCCCGCGCATGAAGCGGAGGAGCTGGACTCCGCATG
CCCAGAGAGCCCCCAACCCCAAGTGCCTGACCTCAGCCTCTACCGCTCTGGCTTGGGCTTGGGCGGGGTCAAGGC
TACCAGTTCTCTTAACAGGTGGCTGGCTGTCTCTTGGCGCGCGTCACTGACAGCTGCCTAGTTCTGCAGTGAGGTG
30 ACCGTGGATGTCTGCCTTCGTTGCCATGGCAACGGGATGACGTTACCAATGTGGGTGTGGAGCTTTCTGTCCGTGTCA
GGAAATCCAAATACCCATAAATACCCTAGAAGAGGAAGTAGCTGAGCCAAAGCTTTCTGGCTTCTCCAGATAAAGTTTG
ACTTAGATGGAAAAPACAAATGATAAAGACCCGAGCCATCTGAAAATCTCCTAATTCACCACCTAGGAATGTGTA
35 TATTATTGAGCTCGTATGTGTTCTATTTTAAAAGAAAACCTTAGTCATSTTATTAATAAGAAATTTCTCAGCAGTGGGA
GAGAACCATATTAACACCAAGATAAAGTTGGCATGATCCACATTGCAGGAAGATCCAGCTTGGGTTTTCAATGATGTG
AAGACCCCATTTATTAAGTCTAAGCTCTGTTTTTGACACTAGGAAGCGATGGCCGGATGGCTGAGGGGCTGTAAGG
40 ATCTTTCAATGTCTTACATGTGTGTTCTCTGTCTGCACCTAGGACCTGCTGCTAGCCTGCAGCAGAGCCAGAGGGGTT
TCACATGATTAGTCTCAGACACTTGGGGCAGGTTGCATGTAAGTGCATGCTTATTTCCATACGGAGCACCTACTATGTG
TCAAACACCATATGGTGTTCACCTTTCAGAACGGTGGTGGTCAATCATGTTSCATTTGCTGACGGTTGGATTGGTGGTAGA
45 GAGCTGAGATATAATGGACGCACTTTCAGCATTCTGTCAACGTTGGCTGTGCATTCTTGTCTCTGAGCAAGTGGCTAAACA
GACTCACAGGGTCAGCCTCCAGCTCAGTCGCTGCATAGTCTTAGGGACCTCTCCAGTCTCCCTACCTCAACTATCCA
AGAAGCCAGGGGCTTGGCGGTCTCAGGAGCCTGCTTGTGGGGACAGGTTGTTGAGTTTTATCTGCAGTAGGTTGCCT
50 AGGCATAGTGTGAGACTGATGGCTGCCTTGGAGAACACATCCTTTGCCCTCTATGCAATCTGACCTTGACATGGGGC
GCTGCTCAGCTGGGAGGATCAACTGCATACCTAAAGCCAAAGCCTAAAGCTTCTCGTCCACCTGAAACTCCTGGACCAAG
GGGCTTCCGGCACATCCTCTCAGGCCAGTGAGGGAGTCTGTGTGAGCTGCATTTCCAATCTCAGGGCGTGAGAGGCAGA
55 GGGAGGTGGGGCAGAGCCTTGCAGCTCTTCTCCATCTGGACAGCGCTCTGGCTCAGCAGCCCATATGAGCACAGGC
ACATCCCCACCCACCCCACTTTCTGTCTCTGCAAAATTTAGGCTCTGTTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGCAGTCC
TATCTCTCTTAGGTAGACAGACTCTGCAGSAGACACTGCTTTGTAAGATACTGCACTTTAAATTTGGATGTTGTGAGG
60 GGAAAGCGAAGGGCCTTTGACCATTAGTCAAGGTACCTTCTAACTCCCATGATTTGGGGGCTACTCTAGTGCTAG
ACATTGCAGAGAGCCTCAGAACTGTAGTTACCAGTGTGGTAGGATTGATCCTTCAGGGAGCCTGACATGTGACAGTTCCA
TTCTTCAACCAGTCACCGAACATTTATTAGTACCTACCCCGTAACAGGCACCGTAGCAGGTAAGTGGAGACGGACCACT
65 CAAAGAACTGACAGACCGAAGCCTTGGAAATATAAACACCAAGCATCAGGCTCTGCCAACAGAACACTCTTAACTCA
GGCCCTTTAACACTCAGGACCCCAACCCCAACCCCAAGCAGTTGGCACTGCTATCCACATTTTACAGAGAGGAAAACTA
GGCACAGGACGATATAAGTGGCTTGCCTAAGCTTGTCTGCATGGTAAATGGCAGGGCTGGATTGAGACCCAGACATTTCCA

ES 2 272 093 T3

TATCTTACCACTAGGCATAGTGGCCCTGTTCTGGAGCCTGCCTTCAGGCTGGTTCTCGGGGACCATGTCCCTGTTTTCT
5 CCCCAGCATATGGTGTTCACAGTGTTCACCTGCGGGTGGTTGCTGAACAAGCGGGGATTGCATCCCAGAGCTCCGGTGCC
TTGTGGGTACACTGCTAAGATAAAATGGATACTGGCCTCTCTCTGACCCTTGCAGAGCTCTGGTGCCTTGTGGGTACAC
10 TGCTAAGATAAAATGGATACTGGCCTCTCTCTATCCACTTGCAGGACTCTAGGGACAGGAATCCATTACTGAGAAAACC
AGGGGCTAGGAGCAGGGAGGTAGCTGGCAGCTGAACTGCTTGGGGACTAACCAATGAATACCAGAGTTTGGATCTCTAG
15 AATACTCTTAAATCTGGTGGGCAGAGTGGCCTGCTCTATCCCAGACTCGGGAGGGGGAGACAGGAATCATCAGAG
GCAACTGGCTAACCAGAAATAGCAAAACACTGAGCTCTGGCTCTGTGAGAGATCCTGCCTTAAATATAGAGAGAGAA
TAAACATTGAAAGAGACAGTAGATGCCAATTTTAAAGCCCCAGATGCACATGGACAAGTGTGGTTTTGAAACACATAT
20 GCACCTCATGTGAAACAGCATGCACACTCGGGCTTATCACACACATATTTGAAAGAGAGAGTGGAGAGGAGAGTGCAC
ATTAGAGTTCACAGGAAAGTGTGAGTGGACACCCCTGCACACAGACATGTGTGCCAGGGAGTAGGAAAGGAGCTGGG
25 TTTGTGTATAAGAGGGAGCCATCATGTGTTTTAAGGAGGGCTGTGAGGAGGGCTTGTGTGGCTGGGACTGGAGCAT
GGTTGTACTGAGCATGCTCCCTGTGGAAACAGGAGGGTGGCCACCTGCAGAGGGTCCCACTGTCCAGGGGATCACT
AAAAGCCCTGCTGAGAACTTTAGGTATAGCCAGAGAGAGAAAGTAGGAAAGTGGGGGACTCCCATCTCTGATGTAG
30 GAGGATCTGGCAAGTAGAGGTGCSTTTGAGGTAGAAAGAGGGTGCAGAGGAGATGCTCTTAAATCTGGGTCAACASTT
TCTTTCCAAATAATGCCTGTGAGGAGGTGTAGGTGGTGGCCATTCACTCACTCAGCAGAGGGATGATGATGCCCGGTGGA
TGCTGGAAATGGCCGAGCATCAACCCCTGGCTCTGGAAGAACTCCATCTTTCAGAAAGGAGATGGATCTGTGTATGGCCAG
35 CGGGGTCACAGGTGCTTGGGGCCCTGSGGGACTCCTAGCACTGGGTGATSTTATCGAGTGTCTTGTGTGCCAGGCAC
TGGCCTGGGGCTTTGTTTTCTGTCTGTTTTTGTTTTGTTTTGAGACAGACTCTTGCTATGTATCCGTGTCAATCTTGG
AATCTCACTGCATAGCCAGGCTGCAGAGAGGGGAGGGCAATAGGCCTTGTAAAGCAAGCCACACTTCAGAGACTAGAC
40 TCCACCCTGCGAATGATGACAGGTGAGAGCTGAGTTCGGGAAGATTTTTTTCCAGCTGCCAGGTGGAGTGTGGAGTGGC
AGCTAGCGGCAAGGTAGAGGGCGAGCTCCCTGTGCAGGAGAAATGCAAGCAAGAGATGGCAAGCCAGTGAATTAAGCAT
TCTGTGTGGGAGCAGGTGGATGAAAGAGAGGGCTGGGCTTTCGCCTCTGGGGGGGGGTGAGGGGTGGGGTAGAGGTGA
45 GAGGAGGGCAGCTCCCTGCAGTGTGATGAGATTTTTCTGACAGTACCTTTGSCCTCTCCCTCCCCCACTTCCCTTCTT
TCCTTTCTTCCACCATTGCTTTCTTGTCTTGGAGAACTCTGAGTTTCCACTTCACTGGTGATGCAGACGGAAACAGA
AGCCGT
50 GTATGTGTGTGAGTGGGAATGGCTCATAGTCTGCAGGAAAGTGGCAGGAAGGAATAAGCTGTAGGCTGAGGCAGTGTGG
GATGCAGGGAGAGAGGAGAGGGATACCAGAGAAAGGAAATTAAGGGAGCTACAAGAGGGCATTGTTGGGGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTTTATATTTGATTTGAAATACTTCTTTAAATAACTTATCCATTTATTTATTTATGTGCACGT
55 GTGTGTGCCCTGCATGAGTTCATGTGTGCCACGTGTGCGGAAACCTTGGAGGCCACAAGGGGGCATCTGATCCCCTGG
AACTGGAGTTGAGGAGGTTGTGAGTCCCCTGACATGTTTGTCTGGAACTGAACCCCGTCTATGCAAGAGCAGGAAGT
GCAGTTATCTGCTGAGCCATCTCTCCAGTCTGAAATCCATCTCTTAAATAACAGTGGCAGAGACATGATGGGATTTA
60 CGTATGGATTTAATGTGGCGTCAATTAAGTTCGGCACAGGCAAGCACCTGTAAGCCATCACCACAACCGCAACAGTGA
ATGTGACCATCACCCATGTTCTTCAATGTTCCCTGTCCCTCCATCCTCCATTCTCAAGCACCTCTGCTCTGCCCTGTG
TCGCTGGAGAACAGTGTGCATCTGCACACTTATGTCACTGAAAGTCAACAGCCTGCACCCCTTCCCTGGTCTGAGTATT
65 TGGGTTCTGACTCTGCTATCACACACTACTGTACTGCATTCTCTCGCTCTTTTTTTAAACATATTTTTATTGTTTTGT
GTGATGCACATGTGCCACATGTGTACAGATACTATGGAGGCCAAGAGGGCCATGGCCGTCCCTGGAGCTGGAGTTACA

ES 2 272 093 T3

GGCAGCGTGTGAGCTGCCTGGTGTGGGTGCTGGGAAGCCAACTTGAATCTAAGCAAGCACTTTTAACTGCTGAGGAGG
 TCTCAGTACCCTTCTTCATTCTCCGCCTGGGTTCCATTTSTATGGACACATGTAGCTAGAPATATCTTGCTTATCTAATTA
 5 TGTACATTGTTTTGTGCTAAGAGAGAGTAATGCTCTATAGCCTGAGGTGGCCTCAACCTTGCCATCCTCCTGCCTCAGGC
 TCCTCCTCCTGAGTGTAGGATGACAGGGGAGTGGTAACTTACATGGTTTTCATGTTTTGTTCAAGACTGAAGGATAACAT
 TCATACAGAGAAGGTCTGGTTCACAAAGTGTGCAGTTCACTGAATGGCCCAACCGTGTATCAAGAAACAAACTCAGGGG
 10 CTGGAGAGATGGCACTGACTGCTCTCCAGAGGTCCGGAGTTCAATTCCAGCAACCCATGGTGGCTCACAGCCATCTA
 TAACGAGATCTGACGCCCTCTTCTGGTGTCTGGAAGCAAGCTACAGTGTACTCACATAAATAAATAAATCTTTAAAG
 ACACACACACACACAAATTACCACCCAGAAAGCCCACTCCATGTTCCCTCCCAAGTCTCTGCCTACAGTACTCCAGGTT
 15 ACCACTGTTTCCAGGCTCTAAGCAACTGGTTTACTTGGGCTCTTTTCTGCTCTGTGGAGCCACACATTTGTGTGCCTCAT
 ACAGGTTCTTTCTAGTAAGTTGCATATTACTCTGGTTTTTACATGTATTTATTTATTGTAGTTGTGTGCGTGTGGGC
 CCATGCATGGCACAGTGTGTGGGATGTCAGAGTATTTGTGAACAGGGGACAGTCTTTTCTTCAATCATGTGGGTTCCAG
 20 AGGTTGAAGTCAAGTCACTGTGTGGCAGCAATGCCTTACCCTGAGACATCTCCATATTCTTTTTTTTCCCTG
 AGGTGGGGGCTTGTTCATAGCCCAACTGGCTTTGCACTTGCAGTTCAAGTGAAGTCCCTGTCTCCACTCTTAGAGTA
 TTGGAATTACGATGTGTAATACCACACCTGACTGGATCATTAATTCTTTGATGGGGGCGGGGAGCGCACATGCTGCAGG
 25 TGAAGGGATGACTGGACTGGACATGAGCGTGAAGCCAGAAACAGCTTCAGTCTAATGCTCTCCCAACTGAGCTATTTG
 GTTTTGCCAGAGAACAATTAACAGAAAGTTCTCAGTGGCCTGTGGATTGGGGTGGAGTTCBACTCATCAGCTTGACAT
 TGGCTCCTCTACCCACTGAGGCTTCTCACTACTCTCTACCTAGATCAATTAATCTTTTTTAAAGACTTATTAGGGGGC
 30 TGGAGAGATGGCTCAGCGGTTAAGAGCACCGAATGCCCTCCAGAGGTCCTGAGTTCATTCACAGCATGCCATTGCTGG
 GCAGTAGGGGGCGCAGGTGTTCAACGTGAGTAGCTGTGCCAGTTTTCCGGGTGGAGAACCTCTTGACACCCCTGCTGT
 35 CCTGGTCATTCTGGGTGGGTGCATGGTGATATGCTTGTGTATGGAAGACTTTGACTGTTACAGTGAAGTTGGGCTTCCA
 CAGTTACCACGTCTCCCTGTTTCTTGACGGCCGGGTGCTTGTCCATTGCCGGAGGGCTACAGCCGCTCCCCACGCTA
 GTTATCGCCTACCTCATGATGCGGCAGAAAGTGGACGTCAAGTCTGCTCTGAGTACTGTGAGGCAGAACTGAGATCGG
 40 CCCCACGATGCTTCTTGGCCCAACTCTGCCAGCTCAATGACAGACTAGCCAAGGAGGGCAAGGTGAAGTCTAGGGTG
 CCCACAGCCTCTTTTGCAGAGGTCTGACTGGGAGGGCCCTGGCAGCCATGTTTAGGAAACACAGTATACCCACTCCCTGC
 ACCACCAGACAGTGCACACATCTGTCCACTCTGGTCTCGGGGGCCACTCCACCCTTAGGGAGCACATGAAGAAGCTC
 45 CCTAAGAAGTTCTGCTCCTTAGCCATCCTTCTGTATTTATGTCTCTCCCTGAGGTGAGGTTAGGTTTATGTCCCTG
 TCTGTGGCATAGATACATCTCAGTGACCCAGGTTGGGAGGGCTATCAGGTCATGGCCGGGACACGGGCACTCTTCAT
 GACCCCTCCCCCCTGGGTTCTTCTGTGTGGTCCAGAACCACGAGCCTGGTAAAGGAACTATGCAAAACACAGGCCCTG
 50 ACCTCCCATGTCTGTTCTCTGCTCTCACAGCCGACACGCCCTGCTGAGGCAGACGATGACATTAAGTTCTGAAGCAG
 AGTGGAGATAGATTAGTACTAGATTTCCAAAAGAAGGAAABAAAAGGCTGCATTTTAAATTAATTCCTTAGAATTA
 55 AGATACTACATAGGGGCCCTTGGTAAGCAATCCATTTTCCAGAGGCTATCTGATTCTTTGGAATGTTAAAGTGT
 GCCTTGCCASAGAGCTTAGGATCTATATCTGTGCTCAGAGCCTCCCTGAGGATGGCTCTGTTCTTTGCTTGTTAGA
 AGAGCGATGCCTTGGCAGGGTTTCCCCCTTTTTCAGAAACAGGGTGTAAAGTCCAGCCTATTACAAACAAACAACAAA
 60 CAAAACAAACAAAGGACCTCCATTTGGAGAATTGCAAGGATTTATCCTGAATTAATAGTGTGGTGGATCAAGTCAATC
 GCCAAGTCTTGCATCCTGGTTGCTATTCTAAGAATAATTAGGAGGAGGAACTAGCCAATTGACAGCTCATGTCCGTGG
 GTGTGTGCACGGGTGCATATGTTGGAAGGGGTGCTGTCCCCTTGGGACAGAAAGGAAAATGAAAGGCCCTCTGCTCAC

ES 2 272 093 T3

CCTGGCCATTTACGGGAGGCTCTGCTGGTTCCACGGTGTCTGTGCAGGATCCTGAAACTGACTCGCTGGACAGAAACGAG
ACTTGGGGGCACCCATGAGAATGGAGAGAGAGAGAGCAAAAGAAAGAACAGCCTTTAAAGAACTTTCTPAGGGTGGTTTT
5 TGAACCTCGCTGGACCTTGTATGTGTGCACATTTGCCAGAGATTGACATAATCCTCTTGGGACTTCACGTTCTCATTAT
TTGTATGTCTCCGGGTACGCGAGAGCCGTGAGCCACCACCCAGCACCCGGCACATAGGCGTCTCATAAAGCCCATTT
TATGAGAACCCAGAGCTGTTTGTAGTACCCCGTGTATAGAGAGAGTTGTTGTGTGTGGGGCACCAGGATCCAGCAGCCCTGGT
10 TGCCTGCCTGTAGGATGTCTTACAGGAGTTTGCAGAGAAACCTTCTTGGAGGGAAAGAAATATCAGGGATTTTTGTGA
ATATTTCAATTCAGCTTTAAGTGTAGACTCAGCASTGTTGATGGTTAAGGTAAGGACATGCCTTTTCCAGAGCTGCT
GCAAGAGGCAGGAGAAGCAGACCTGTCTTAGGATGTACTCCAGGGTAAGACCTCTGATCACAGCAGGAGCAGAGCTG
15 TGCAGCCTGGATGGTCAATTGTCCCTATTCTGTGTGACCCACAGCAACCCCTGGTCAGATAGGGCTGGTCACTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAGAAATGAAGTACCATAGCCAASTTGTGTACCTCAGTCTTTAGTTTCCAGCGCT
CTCTTGTCAATACAAATGTGCATTTCAAAATAACACTGTAGAGTTGACAGAACTGGTTTCAATGTGTTATGAGAGAGGAAA
20 GAGAGGAAAGAAACAAAACAAAACAAAACACCACAAAACAAAACATCTGGGCTAGCCAGGCATGATTGCAATGTCTACAG
GCCCAGTTCAATGAGAGGCAGAGACAGGAAGACCGCCGAAAGTCAAGGATAGCATGGTCTACGTATCGAGACTCCAGGCA
GGGCTACGGTCCCAAGATCCTAGGTTTTGGATTTTTGGGCTTTGGTTTTTGTAGACAGGGTTTTCTGTGTAGCCCTGGCTG
25 TCCTGGAACTCGCTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCAAACTTAGAGATCTGCTGACTCTGCCTTTGAGGGCTGGGACGAAT
GCCACCCTGCCAACTAAGATTCCATTAATAAATAAATAAGTTCAAGATAATTAAGAGTTGCCAGCTCGTTAAAGCTAA
GTAGAAAGCAGTCTCAGGCTGTGCTTGTAGGCTGTCTTGGCTTGSACCTGAATCTGCCCAACAGTGTCCAAAGTCA
30 CATGACTTTGAGCCATCTCCAGAGAAGGAAGTAAAATGTGGCTCCCGAGTCGATTGGGACACAGTCTCTCTTTGTCTA
GGTAACACATGGTGACACATAGCATTGAACTCTCCACTCTGAGGGTGGGTTTTCCCTCCCCCTGCCTCTTCTGGGTTGGTC
35 ACCCCATAGGACAGCCACAGGACAGTCACTAGCACCTACTGGAACTCTTTGTGGGAAATGAAGAAAGAGCCTTTGGG
AGATTCCTGGCTTTCCCTTAGGGCTGAAAGTACAACSGTTCTTGGTTGGCTTTGCCCTCGTGTATAAATACTAGCTACTA
TTCTTCAGGTAATAATACCGATGTTGTGGAAAGCCAACCCCGTGGCTGCCCTGAGTAGGGGGTGGGGTTGGGAATCCTG
40 GATAGTGTCTATCCATGGAAAGTGGTGGAAATAGGAATTAAGGGTGTCCCCCCCCCCCCAACCTCTTCTCAGACCCAG
CCACTTTCTATGACTTATAAACATCCAGGTAATAATACAAACATAAATAATGGTTTCTCTTCTCAATCTTCAAAGTCTG
CCTGCCTTTCCAGGGGTAGGTCTGTTTCTTGTCTGTTCTATTGTCTTGAGAGCACAGACTAACACTTACCAAATGAGGG
45 AACTCTTGGCCATACTAAGGCTCTTCTGGGCTCCAGCACTCTTAAGTTATTTAAGAAATCTCCTTGGCCTTTAGCAC
ACCCGCCACCCCAAGTGGGTGTGGATAATGCCATGGCCAGCAGGGGGCACTGTTGAGGCGGGTGCCTTTCCACCTAAG
TTGCTTATAGTATTTAAGATGCTAAATGTTTTAATCAAGAGAAGCACTGATCTTATAATACGAGGATAAGAGATTTTCTC
50 ACAGGAAATGTCTTTTCATAATCTTTTACAGGCTTTGTCTGATCGTAGCAATAGAGAGAATAGCTGGATATTTAATCT
TGTATTCCATTTCTCTGCCAGCGTTAGGTTAACTCCGTAAAAGTGATTCAGTGGACCGAAGAGGCTCAGAGGGCAGG
55 GGATGGTGGGGTAGGGCAGAGCACTGTACCTGCCAGGCATGGGAGGTCTGCCATCCGGGAGGAAAAGGAAAGTTTAGC
CTCTAGTCTACCACAGTGTAAACGCACTCTAAAGTTGTAACCAATAAATAATGTCTTACATTAACAAAGACGTCTGTTTTG
TGTTCCTTTTGTGTGTTTGGGCTTTTTATGTGTGCTTTAATACTGCTGTGGTGGTGTGTTGTAGTTTTGAGGTAGGA
60 TCTCAGGCTGGCCTGAACTTCTGATCGCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGTCCCTGCCTCCAAGTGTAGGACT
AAAAGCACAATGCCACCACACCAGTACAGCATTTTTCTAACATTTAAATAATCACCTAGGGGCTGGAGAGGGTTCCA
GCTAAGAGTGCACACTGCTCTTGGGTAGGACCTGAGTTTGTCCAGAACCTATACTGGGTGGCTCCAGGTCCAGGAG

ES 2 272 093 T3

5 TCCAGGACCTCTGGCCTCCATGGRCATCTGCTCTTAGSACATACCCACATACAGATACACACATAAADAATAAATGAAGC
 CTTTAAAAACCTCCTAAAACCTAGCCTTTGGAGGTACGACTCTGGAAAGCTGGCATACTGTGTAAGTCCATCTCATGGTG
 10 TTCTGGCTAACGTAAGACTTACAGAGACAGAAAGAACTCAGGGTGTGCTGGGGTTGGGATGGAGGAAGAGGGATGAGT
 AGGGGGAGCACGGGAACCTGGGCAATGAAAATTCTTTACAGGACACTAGAGGAGGATAAATACCAGTCATTGCACCCAC
 TACTGGACAACCTCCAGGAATTATGCTGGGTGAAAABAAAGGCCCCAGGTATTGGCTGCATTGGCTGCATTTCGTAAC
 15 ATTTTTTTAAATGAAAAGAAABAAATGTAATCAAGCTTAGATGAGTGGTTGCTGTGAGCTGAGAGCTGGGGTGAGTGA
 GACATGTGGACACTCCATCAAAAACGACAGAAAGAAAGGGCTGTGGTGACAGCTACCTCTAATCTCCACCTCCGGGAG
 GTGATCAGGGTTAGCCCTCAGCTAAGCTGTGGTGCATGAAAGCTGTTTTCAAAAACCTTTAATAAGAAATAATGAAAAA
 20 GACATCAGGGCAGATCCTTGGGGCCAAAGGGGACAGGCGAAGCTCTGTTGTAAGGTGATAGAAAGGGATGATGAGCA
 CGTCCCGACGCATCATGAGAGAAGCCTAGGTAAAGTAAAGTATGGATGTGAGTGTGTGGGGTCCGGGCACCTGCACGCTCT
 GGCTGTGGTGTGGACTGGCATCTTTGGTGAGCTGTGAAAGGGAAAATGGGTAGGGAGATCAAAAATCCCTCCGAATTAT
 25 TTCAAGAACTGTCTATTACAATTATCTCAAAATATTTAAABAAAGAAAGATTAAALAACAAAABACCTATCCAGGTGTG
 GTGGTGTGCACCTATAGCCACGGACACTTTGGAAAGCTGAGGCAAGAGGATGGCGAGTTTGAAGGTATCTGGGGCTGTACA
 GCAAGACCCGCTCCCAAACCAAAACAAACAGCAAAACACATTATGTGACACAGAGTGTATATAGTGAGCGGCCTCGCT
 30 GAGAGCATGGCTGGGGTGGGGTGGGGACAGAAATATCTAABCTGCAGTCAATAGGATCCACTGAGACCCCTGGGGC
 TTGACTGCAGCTTACCTTGGGAATGATAAGGTTTTCTGTTGAGTAAAGCATCGATTACTGACTTAAGCTCAATGA
 AGAAAAGAAAAGAAAACAAACAAAGCCAAACCAAGGGGCTGGTGAGATGGCTCAGTGGGTAGAGACCCCGACTGC
 35 TCTTCCGAAGGTCCAGAGTTCAAATCCACAGCAACCACTGCTGGCTCACAACCATCTGTACGAGATATGATGCCCTCTT
 CTGGTGTGTGTGAAGACAGCTACAGTGTACTTACATATATATAATCTTTAAAAAAAAPAAAAAABAAAGCCAAA
 CCGAGCAAAACAGGCCCCCAACAAAGGAGGACAGAAAGGACAGCCAGCCATCCTGTGAAAGGCAAGGGCTACC
 40 CATGGCCGAGGAGGGTCCAGAGAAATAGGCTGTAAGCTCAGTTTCTCTGTATACCCTTTTTCTTGTGTACACTACTTC
 AATTACAGATAAAATAACAAATAAACAAPATCTAGAGCCTGGCCACTCTCTGCTCGCTTGATTTTTCTGTACGTCCAG
 CAGGTGGGGAAAGTGTCCAAAGGACAGATCGCATCATTTAGGTGGCCAGCATAATCTCCCATCAGCAGGTGGTGTGTGA
 45 GAACCATTATGGTGTCTACAGAAATCCGGGCCCAGGAGCTGCCCTCTCCCAAGTCTGGAGCAATAGGAAGCTTTCTGGC
 CCAGACAGGGTTAACAGTCCACATTCAGAGACAGGGGAAAGGAGACTGGAGGTACAGACAAABGGGCCAGCTTCTAAC
 AACTTCACAGCTCTGGTAGGAGAGATAGATCACCCCAACAATGGCCACAGCTGGTTTTGTCTGCCCGAAGGAAACTGA
 50 CTTAGGAAGCAGGTATCAGAGTCCCCTTCTGAGGGGACTTCTGTCTGCCCTGTAAAGCTGTGAGGACGTGCATTGAT
 GTGTGGGTGACAGAAGATGAAAAGGAGGACCCAGGCAGATCGCCACAGATGGACCGGCCACTTACAGTCCGAGGCAGGTG
 GCAGAGCCTTGACAGAGCTCTGCAGGTGGAGCAGACTGATTCATTACCCAGTTAGCATACCACAGCGGGCTAGGCGGACC
 55 ACAGCCTCCTTCCAGTCTTCTCCAGGGCTGGGGAGTCTCCAACCTTCTGTCTCAGTGCAGCTTCCGCCAGCCCTCC
 TCCTTTTGACCTGAGGTGTGAACCTCCCTCTCTCTCTCTCCCTGTGGCATGGCCCTCTGCTACTGCAGGCTGAGCA
 TTGGATTTCTTTGTGCTTAGATAGCCTGAGATGGCTTTCTGATTTATATATATATATCCATCCCTTGATCTTACATCT
 60 AGGACCCAGAGCTGTTTGTGATACCATAAGAGGCTGGGGAGATGATATGGTAAGAGTGTGCTGTACAAAGCATGAAGAC
 ATGAGTTCGAATCCCCAGCAACCATGTGGAAAATAACCTTCTAACCTCAGAGTTGAGGGAAAGGCAGGTGGATTCTGG
 65 GGGCTTACTGGCCAGCTAGCCAGCCTAACCTAAATGTCTCAGTCAAGATCCTGTCTCAGGGAATAACTTGGGAGAAATGA
 CTGAGAAAGACACCTCCTCAGGTCTCCCATGCACCCACACAGACACACGGGGGGGGTAAATGTAATAAGCTAAGAAAATA

ES 2 272 093 T3

ATGAGGGGATGATTTTTTGGCTAAGAAATGAAATTCCTGTGTTGGCCGCAAGAAGCCTGGCCAGGAAGGAAGTGCCTTTG
GCACACCAGCCTATAAGTCACCATGAGTTCCTGGCTAAGAATCAGATGTARTGGAGCCCAAGTCCCTCTTCCCTGGTGG
5 TTGCCTCTCCCACTGGTTTTGAAGAGAAATCAAGAGGATCTCCTTGGTCAGAATTGTAGGTGCTGAGCAATGTGGAGC
TGGGGTCAATGGGATTCCTTTAAGGCATCCTTCCCAAGGCTGGGTCACTTCAATAGTAGGGTGCCTGCACAGCAAGC
GTGAGACCCCTAGGTTAGAGTCCCCAGAAATCTGCCCCCAAGCCCAABAAGGCATCCTTCTCCCTCTGGGTGGGTGGGG
10 GAGCAAACACCTTTAACTAAGACCATTAGCTGGCAGGGSTAACAAATGACCTTGGCTAGAGGPAATTTGGTCAAGCTGGAT
TCCGCCTCTCTAGAAAGCCCACTTSTTTCTTTGTTAAGCTGGCCCAAGTTTGTTTTGGAAATGCCTGAGGGGCCAG
GGAGCCAGAGCAATTAAGGCCAAGCTCATTTTGATATCTGAAAACCAAGCCTGACTGCCCTCCCGTGGGAGGTACTGG
15 GAGAGCTGTCCTGTGTCCCTGCCTCACCAACGCCCCGCGCCCAACAGAGCCTCCTCGGGTCACTGGGAGGTGCCAGCAG
CAATTTGGAAAGTTTACTGAGCTTGAAGTCTTGGGAGGGCTGACGCTAAGCACACCCCTTCTCCAGCCCCCCCCACCCC
ACCCCGCTGAGGAGGAGGTTGAGGAACATGGGACCAGCCCTGCTCCAGCCCGTCTTATTGGCTGGCATGAGGCAGAGG
20 GGGCTTTAABAAGCAACCGTATCTAGGCTGGACACTGGAGCCTGTCTACCGGTGCCCTCCTCCACCTGGCAGCATGC
AGCCCTTACTAGCCCGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCAGGCTGCCCTTCTGTGCTGTGAGGGGCCAGGGGTGGCAAGCC
TTCAGGAATGATGCCACAGAGGTTCATCCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAGCACAGACCATGAA
25 CCGGAGGAGAAATCGIAGGCAGACCTCCCCACCATCCTATGACGCCAAGGATCGGGATGAGGAGCACATTAGTGGGGG
GAGAAATCTWAGAGGTGACTGGGGTGGTTTTAGCATCTTCTTCAGAGGTTTGTGTGGGTGGCTAGCCTCTGTACATCA
CGAGAGGAGGCAATTTGCCTGGAAGAATACTAGCACAGCATTAGAACCTGGAGGGCCAGCATTGGGGGGCTGGTAGAGAGC
30 AGCCAGGAGGAGGTTGAGGCTGAGGTGAGCCGAGCTGGCATTAAACAGGGCATGGGCTTGTATGATGGTCCAGAGAAATC
TCCCTCTAAGAAATGAGGACACAGGTGAGATCTAGCTGCTGACCAGTGGGGAAATGATATGTTGAGGCTGGATGCCAGATG
CCATCATGCTCTACTATATCCACATGACCACCCATGAGGTAAAGAAAGGCCCCAGCTTGAAGATGGAGAAACCCGAGA
35 GCTCTCTGAGGTAAGTCACTGGGAGTAAAGAGAGCTGAGACTGGAAGCTGGTTTGTATCCAGATGCAAGGCAACCCTAG
ATTGGCTTTGCTGAGAACTGAGGCCAGGAGGATCCCTTTAGTTCCCCCTTGCCAGGGTCTGCTCAATGAGCCCAGA
GGTTAGCATTAAAGAAACAGGGTTTGTAGGTGGCATGTGACATGAGGGGCAGCTGAGTGAATGTCCCCTGTATGAGCA
40 GAGGTGGCAATACTTCCCTGAGCTTGCACCCTGACCCCGCTTTGCCTCATCCTGAGGACAGCAGAAACTGTGGAGGC
AGAGCCAGCCAGAGAGATGCCTGGGGTGGGGTGGGGTATCAGCACGGAAGTACAGCAATGAAATGGGGTGGGGTGG
CAGCTGAGGAGACTCCAGAGAAATGACCTTGTGGTCAACATTTGTGTGGGAGGAGAGCTCATTTTCCAGCTTGCAC
45 CACATGCTCTCCCTCCTGTCTCCTAGCCAGTAAGGGATGTGGAGGAAAGGGCCACCCAPAGGAGCATGCAATGCAGTCA
CGTTTTTCCAGAGGAAAGTCTTACCTAAGGGCACTATTCTTGGAAAGCCCCAAAAGTCTTCCCTGGGCAACAGG
CCTCCCGACATACCACCTCTGCAGGGGTGAGTAAATTAAGCCAGCCACAGAAAGGGTGGCAAGGCCTACACCTCCCCCT
50 GTTGTGCCCGCCCCCGTGAAGGTGCATCCTGGCCTGCCCCCTTGGCTTTGGTACTGGGATTTTTTTTTTCTTT
TTATGTCATATTGATCCTGACACCATGGAATTTTGGAGGTAGACAGGACCCACACATGGATTAGTTAAAAGCCTCCCAT
CCATCTAAGCTCATGGTAGGAGATAGAGCATGTCCAAGGAGAGGGCCAGGCATCAGACCTAGAAGATATGGCTGGGCAT
55 CCAACCCATCTCCTTCCCGGAGAACAGACTCTAAGTCAATCCAGCCACCCCTTGAATACCAGCTCAAGGTACACAGA
ACAGAGAGTCTGGTATACAGCAGGTGCTAAACAAATGCTTGTGGTAGCAAAAGCTATAGGTTTTGGGTGAGAATCCGA
CCCAACTCGCGAGTGAAGAGCGAAAGGCCCTCTACTCGCCACCGCCCCCGCCCCCCTGGGGTCTATAACAGATCACTT
60 TCACCCTTGGGGAGCCAGAGGCCCTGGCATCCTAGGTAGCCCCCCCCCCCCCCCCCGCAAGCAGCCAGCCCTGCC

ES 2 272 093 T3

TTTGGGGCAGTCTTTTCTCAGCCTGACCTGTGATAATGAGGGGGTTGGACCGGCCCCCTTTGGTCGCTTCAAGTCT
 AATGAAATCTTATCCCTACCACCTCCCTTCTACCCGCTCCTCCACAGCAGCTGTCTGATTTATTACCTTCAATTAAC
 5 CTCCACTCCTTTCTCCATCTCCTGGGATACCGCCCTGTCCAGTGGCTGGTAAGGAGCTTAGGAAGGACACAGAGCCAG
 GTGTGGCTAGAGGCTACCAGGCAGGGCTGGGGATGAGSAGCTAAACTGGGAGAGTGTTTGGTTAGTAGSCAFAAGCCTT
 10 GGGTGGGATCCCTASTACCGGAGAGTGGAGATGGGCGCTGAGAAGTTCAGACCATCCATCCTTAAGTACACAGCCAGT
 TTGAGGCCAGCCTGGGCTACATAAAACCCAATCTCAAAAGCTGCCAATTCTGATTCTGTGCCACGTAGTCCCGATGTA
 ATAGTGGATGAATCTGATCTGGGGCAACCTATTTTACAGATGTGGGAAGGCAACTTTAAGTACCCCTGCCGACA
 15 GATCACAAGAAAGTAAAGTACAGAGAGCTCCAGTGTTCATCCCTGGGTTCCAGGACAGGGAGAGAGAGGACAGGGTGGG
 ATCTGACTGCTCCCGGTGGCTCCTTCCATAATCCATACAGATTCGAAAGGCCAGGGCAGGTTTGGAAAAGAGAGAA
 20 GGTGGAGAGGAGCAGACCAGTCTGGCTAGGCTGCAGCCCTCACGCATCCTCTCTCCGCAGATGTGTCCGAGTACAGCT
 GCGGGAGCTGCACTACACCCGCTTCTGTACAGAGCGGCCATGCCGCAGCCCAAGCCGTTACCCAGTGGTGTGCTCC
 25 GGGCATGCGGCCCGCGCGCTGCTGCCCAACGCCATCGGGCGCTGAAGTGGTGGCGCCGAACGGACCGGATTTCC
 CTGCATCCCGATCGCTACCGCGCGCAGCGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGGCGCGCGCCCGCTCGCGCAAGGTGC
 30 GTCTGGTGGCTCGTGCAGTGCAGCGCTCACCCGCTTCCACAACCAGTGGGAGCTCAAGGACTTCGGGCGGGAGCC
 GCGCGCGCGCAGAAAGGTCGCAAGCGCGCGCCCGGGCGCGGGGAGCCAAAGCCAACCCAGGCGGAGCTGGAGAACGCTA
 CTAGAGCGAGCCCGCCTATGCAGCCCGCGGATCCGATTCTTTTTAGTGTAAAGCCTGCAGCCAGGCCAGGGGT
 35 GCCAACTTTCCAGACCGTGTGGAGTTCACAGCCAGTAGAGACCGCAGGTCTTTCTGCCCGCTGCGGSSGATGGGGAGG
 GGGTGGGTTCGCCCGGGCCAGGAGAGGAGCTTGAAGTCCAGACTCTGCCCTAGCCCGGGTGGGATGGGGTCTTTCTA
 CCGTCCCGGAACCTATACAGGACAAAGCAGTGTTCACACTTAAAGGGAAGGGAGTGTGGAACGAAAGACCTGGGACTGG
 40 TTATGGAGCTACAGTAAAGATCTACTCCTTCCACCCAATGTAAAGCCTGCGTGGGCTAGATAGGGTCTGTACCCCTGACC
 TGGCCACTGAGTGTGATGTTGGGCTACGTGGTCTCTTTTGGTACGGTCTCTTTTGTAAAATAGGGACCGGAACCTGCT
 45 GAGATTCCAAAGGATTGGGGTACCCCGTGTAGACTGGTGAAGAGAGAGAGACAGGGGAGGGGTTAGGGGAGAGATTGTGG
 TGGCAACCGCCTAGAAGAGCTGTTTGTGGCTCCAGCCTCGCCGCTCAGAGGTTTGGCTTCCCCACTCCTTCCCTC
 TCAATCTGCCTTCAAATCCATATCTGGGATAGGGAAGGCCAGGTCGAGAGATGGTGAAGGGCCAGAAATCACACTC
 CTGGCCCCCGAAGAGCAGTGTCCCGCCCCAACTGCCTTGTATATTGTAAAGGATTTTCTACACAACAGTTTAAAGT
 50 CGTTGGAGGAAACTGGGCTTGCAGTCACTCCCTCCTTGTCCCTTGGCAGGACACCACCTCCTGCCTGCCACCCACGG
 ACACATTTCTGTCTAGAAACAGAGCGTGTGCTGCTGCTCCTCTGAGACAGCATATCTTACATTA AAAAGAAATATACGGG
 55 GGGGGGGGGGGAGGGCGCAAGTGTATACATATGCTGAGAAGCTGTGAGGCGCCACAGCACCACCCACAATCTTTTTGT
 AAATCATTTCCAGACACCTCTTACTTTCTGTGTAGATTTTAAATGTTAAAAGGGGAGGAGAGAGCGTTTGTAAACAGAA
 GCACATGGAGGGGGGGTGGGGGTTGGGCTGGTGAGTTTGGCGAACTTCCATGTGAGACTCATCCACAAGACTGA
 60 AAGCCCGTTTTTTTTTTAAGAGTTCAGTGACATATTTATTTTCTCATTTAAGTTATTTATGCCAACATTTTTTTCTTG
 TAGAGAAAGCAGTGTAAATATCGCTTGTGAAGCACAAGTGTGTGGTTTTTTGTTTTTTTCCCCGACCAGA
 GGCATTGTTAATAAAGACAATGAATCTCGAGCAGGAGGCTGTGGTCTTGTTTTGTCAACCACACACAATGTCTGCCACT
 65 GTCATCTCACTCCCTTCCCTTGGTCACAAGACCCAACTTGCACACCTCCGACTGCTCTCTGGTAGCCCTTGTGGCA
 ATACGTGTTTCTTTGAAAAGTCAATTCATCCTTTCTTTGCAAACCTGGCTCTCATTTCCCAGCTGGGTATCGTCAT
 ACCCTCACCCAGCCTCCCTTAGCTGACCACTCTCCACTGTCTTCAAAGTGCAGTTCACCGAGCCAGTTCCT

ES 2 272 093 T3

GGTCCAAGTCATCCATTGCTCCTCCTTGGCTCCAGACCCCTTCTCCACAAAGATGTTTATCTCCCACTCCATCAAGCCCC
AGTGGCCCTGCGGCTATCCCTGTCTCTTCAGTTAGCTGAATCTACTTGTGACACCACATGAATTCCTTCCCCTGTCTTA
5 AGGTTTATGGAACTCTTGCCTGCCCTGAACCTTCCAGGACTGTCCAGCGTCTGATGTCTCTCTCTTGTAAAGCCC
CACCCCACTATTTGATTCCCAATTCTAGATCTTCCCTTGTTCATTCCTTACGGGATAGTGTCTCATCTGGCCAAGTCTT
GCTTGTATTTGGGATAAATGCAAGCCAAAGTACAATTGAGGACCAGTTTCATCATTTGGGCCAAGCTTTTTCAAAATGTGA
10 TTTTACACCTATAGAAGGTAAAGCCCTTCCAAGCAGAGGCAATGCCTGGCTCTTCCCTCAACATCAGGGCTCCTGCTT
TATGGGTCTGGTGGGTAGTACATTCATAPCCCAACACTAGGGTGTGAABGCAAGATGATTGGGAGTTGAGGCCAAT
CTTGGCTATGAGGCCCTGTCTCAACCTCTCCTCCCTCCCTCCAGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAACTG
15 CAACACTTTAAATCCAGTCAAGTGCATCTTTGGGTGAGGGGACTCTATCCCTAATATPAGCTTCCATCTTGATTTGTGT
ATGTGCACACTGGGGTGAACCTGGSCCTTTGTACCTGCCGGGCAAGCTCTCTACTGCTCTAPCCAGCCCTCACTGG
CTTTCTGTTTCAACTCCCAATGAATTCCTCAATGAATTATCAATATCATGTCTTTGAPAAATACCAATTGAGTGTCTGT
20 GGTGTCCCTGTGGTCCAGATTCCAGGAAAGGACTTTTCAGGGAATCCAGGCATCCTGAPAAATGTCTTAGAGCAGGAGGC
CATGGAGACCTTGGCCAGCCCCACAAGGCAGTGTGGTGCAGGGGTGAGGATGGAAGGCAGGCTTGAATTGAAGCTGAGA
CAGGGTACTCAGGATTAABAAAGCTTCCCCAACAATTCACAGATCAGTTCCCTGGTACTGCACCTGTTAGCTATGCA
25 GAGCCCACTGGGCATAGGTGAAGACACCGGTTGTACTGTCTACTACTACTGTGCTTACAGAGCCGGCAGAGACAATAAT
GTTATGTTGACCCCAAGGGACAGTGTATCCAGAAGGAACACAGAGAGAGTGTCTGTAGAGGCTGCTGAGGAGGAGGG
GTCCCAGACTCTTAAGCAAAGACTCCACTCACATAAAGACACAGGCTGAGCAGAGCTGGCCGTGGATGCAGGGAGCCCA
30 TCCACCATCCTTTAGCATGCCCTTGTATTCCCATCACATGCCAGGGATGAGGGGCATCAGAGAGTCCAAGTGTGCCAA
ACCCAAACACACCTAGGACTTGTCTTCTGGGACAGACAGATGCAGGAGAGACTAGGTTGGGCTGTGATCCCATTACCACA
AAGAGGGAAABAAACAAAACAACAAACAPACAAAAAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
35 GGTGAGGTTAGAGTTATTTATGGAAAGTTATATTCTACCTCCATGGGGTCTACAAGGCTGGCGCCATCAGAAAGAACA
AACAAACAGGCTGATCTGGGAGGGTGGTACTCTATGGCAGGGAGCAGTGTGCTTGGGGTACAGCCAGACACGGGCTTG
40 TATTAATCACAGGGCTTGTATTAATAGGCTGAGAGTCAAGCAGACAGAGAGACAGPAGGAAACACACACACACACACA
CACACACACACACACACACATGCACACACCCTCACTTCTCACTCGAAGAGCCCCACTTACATTCTAAGAACAAACC
ATTCTCCTCATAAAGGAGACAAAGTTGCAGAAACCCAAAGAGCCACAGGGTCCCCACTCTCTTTGAAATGACTTGGAC
45 TTGTTGCAGGGAAGACAGAGGGTCTGCAGAGGCTTCCCTGGGTGACCCAGAGCCACAGACACTGAATCTGGTGTGAGA
CCTGTATAAACCCTCTTCCACAGGTTCCCTGAAAGGAGCCACATTCCCCAACCTGTCTCCTGACCACTGAGGATGAGA
GCACCTGGGCCCTTCCCCATCTTGGAGTGCACCTGGTTTCCCCATCTGAGGSCACATGAGGTCTCAGGTCTTGGGAAAG
50 TTCCACAAGTATTGAPAGTGTCTTGTGTTTTGTTTTGTGATTAATTTAGGTGTATGAGTGTCTTTGCTTGAATATATGCTT
GTGTAGCAATTTACAAGCCTGGTGCCTGAGGAGATCAGAAGATGGCATCAGATACCCTGGAACCTGGACTTGCAGACAGTTA
TGAGCCACTGTGTGGTGTAGGAACAGAACCTGGATCCTCCGGAAGAGCAGACAGCCAGCGCTCTTAGCCACTAAGCCA
55 TCACCTGAGGTTCTTTCTGTGGCTAAAGAGACAGGAGACAAAGGAGAGTTCTTTTGTCAATAGGACCATGAATGTTCTT
CGTAACGTGAGACTAGGGCAGGGTGTATCCCCAGTGACACCGATGGCCCTGTGTAGTTATTAGCAGCTCTAGTCTTATTC
CTTAATAAGTCCCAGTTTGGGGCAGGAGATATGTATCCCTGCTTTGAAAGTGGCTGAGGTCCAGTTATCTACTTCCAAGT
60 ACTTGTCTCTCTTCTGGAGTTGGGGAAGCTCCCTGCCTGTAAATGTGTCCATCTTCAACCTTAGACAAGATCAC
TTTCCCTGAGCAGTCAAGCCAGTCCAAGCCCTTCAATTTAGCTTTTATAAGGAACACCCCTTTTGTGGGTGGAGGTAG

ES 2 272 093 T3

CTGTAGCA3CCCTCCGCTGAGGGGCTCCAGGTGGGCGCCCAAGGTGCTGCAGTGGGAGCCACATGAGAGGTGATGTCTTG
5 GAGTCACCTCGGGTACCATTGTTTAGGGAGGTGGGATTGTGGTGTGGASACAGGCAGCCTCAAGGATGCTTTTCAACA
ATGGTTGATGAGTTGGAACATAAACAGGGGCCATCACACTGGCTCCCATAGCTCTGGGCTTGCCAGCTTCCACATCTGCC
CCCCACCCCTGTCTGGCACCAGCTCAAGCTCTGTGATTCTACACATCCAAAAGAGGAAGAGTAGCCTACTGGGCATGCC
10 ACCTCTTCTGGACCATCAGGTGAGAGTGTGGCAAGCCCTAGGCTCCTGTCCAGGATGCAGGGCTGCCAGATAGGATGCTC
ASCTATCTCCTGAGCTGGAACTATTTTAGGAATAAGGATTATGCCCGCCCGGGTTGGCCAGCACCCAGCAGCCTGTGC
TTGCGTAAABAGCAAGTGTGTTGATTTATCTAABACAGAGCCGTGGACCCACCCACAGGACAAGTATGATGCATCTGT
15 TTCATGTATCTGAAAGCGACACAACCATTTTTACATCATGGCATCTTCTAACCCTTCTTTTTTTGTTTTGTTTTT
TTGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGTCTGGCTGTCTGGAAGTCACTTTGTAGACCAGGCTGGCCTGGAAGTCAAGAAATC
CTGGGATTAABAGTGTGTGCCACCACGCCCGCCCTAACCCCTTCTTAATGGTGATCCAGTGGTTGAATTTCGGGCC
20 ACACACATGTCCATTAGGGATTAGCTGTCTTCTGASACTCCTGGTACAATCTTTATCCCTGGGGCTGGGCTCCTG
ATCCCTGACTCGGGCCGATCAAGTCCAGTTCTGGGCCGATCAAGTCCAGTTCTGGGCCGACAGTCCAGTCCCT
AGCTCGATTAGCTCATCCTGGCTCCCTGGCCTGTTCTTACTTACACTCTTCCCTTGTCTGGACTTGTGCTTTCTTTA
25 CTCAGTTGTCTGCCACAGTCCCTAAGCCACCTCTGTAGACAACATAAGATAATACTTCCCTCAAGCACGGAAAGTCTG
AGTCACCACACCCCTCTGGAGGTGTGTGGACACATGTTCAATGGTGTGGTTGCGCTTACGTACGTGTGC

30 SEQ ID NO. 18: Secuencia Genómica de BEER Humana (Este gen tiene dos exones, en las posiciones 161-427 7
3186-5219)

35 tagaggagaa gtctttgggg agggtttgc ctgagcacac cctttccct cctccgggg 60
ctgagggaaa catgggacca gccctgccc agcctgtcct cattggctgg catgaagcag 120
40 agaggggctt taaaagggc accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa 180
45 ggtggcgtgc cctcctctgg ctggtacat gcagctccca ctggccctgt gtctcgtctg 240
cctgctggta cacacagcct tccgtgtagt ggagggccag ggggtggcagg cgttcaagaa 300
50 tgatgccacg gaaatcatcc ccgagctcgg agagtacccc ggcctccac cggagctgga 360
55 gaacaacaag accatgaacc gggcggagaa cggagggcgg cctccccacc accccttga 420
gaccaaaggt atggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggttttaga 480
60
65

ES 2 272 093 T3

aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagacca gtgaagattg ctggcctctg 540
5 ccagcactgg tccaggaaca gtcttgccctg gaggtggggg aagaatggct cgctgggtgca 600
gccttcaaat tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tgggtgagagc ccagggcagg 660
10 gaggacgctg ggggtggtag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag 720
aaaagaaaag gtttcaaaga atctcctcct gggaaatag gagccacgtc cagctgctgg 780
15 taccactggg aagggaaaca ggtaaggag cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg 840
caccggacac tctatgctgg tgggtggctgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc 900
cccaggaggt gaacccccag ctccaagggg aagaacagg ttccaggcac tcagtaactt 960
25 ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgatcca actgcaagat agccctgggtg 1020
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca 1080
30 cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcaactgaa ggaatgggag 1140
ttttcggcac agttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag 1200
35 agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccacc cagtcccaac 1260
40 cttgcctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaaccct gggttcctgg tcaggcctgc 1320
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcattc ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc 1380
45 atqggggcgt ctgaaatgac acttcagact ccgagcttcc ctgtccctctg gccattatcc 1440
aggtggcaga gaagtccact gccaggetc ctggacccca gccctccccg cctcacaacc 1500
50 tgttgggact atgggggtgct aaaaagggca actgcatggg aggccagcca ggaccctccg 1560
55
60
65

ES 2 272 093 T3

tcttcaaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc 1620

5 tgggctccag cgactgcctg aagggctgta aggaacccaa acacaaaatg tccaccttgc 1680

tggactccca cgagaggcca cagcccctga ggaagccaca tgctcaaaac aaagtcatga 1740

10 tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggcg ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct 1800

tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc 1860

15 aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctcccctgc 1920

20 tgtgcttgct cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtcccctc tctggtttgg 1980

tcttaagact atttttcatt ctttcttgtc acattggaac tatccccatg aaacctttgg 2040

25 ggggtggactg gtactcacac gacgaccagc tatttaaaaa gctcccaccc atctaagtcc 2100

30 accataggag acatggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc 2160

tctgcctgcc cagggagtat caccatgagg cgcccattca gataacacag aacaagaaat 2220

35 gtgcccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtaggt tttgggtcag 2280

40 agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc 2340

cccagcccag cctcccatgg atgctcgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa 2400

45 ggtgctggga ccccagggaa gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc 2460

ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggttggac aactgcctt 2520

50 tgattccttt caagtctaata gaattcctgt cctgatcacc tccccttcag tccctcgcct 2580

55 ccacagcagc tgccctgatt tattaccttc aattaacctc tactccttcc tccatccctt 2640

60

65

ES 2 272 093 T3

gtccaccct cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcagaagg 2700
5 tgtgctgagt acttaccctg cccagggcag ggaccctgcg gcacaagtgt ggcttaaate 2760
ataagaagac cccagaagag aatgataat aataatacat aacagccgac gctttcagct 2820
10 atatgtgccca aatggtattt tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttgg 2880
ggcggcccat tttgcagaca ggaagaagag agaggttaag gaacttqccc aaqatqacac 2940
15 ctgcagtgag cgatggagcc ctgggtgttg aaccccagca gtcatttggc tccgagggga 3000
20 cagggtgcgc aggagagctt tccaccagct ctagagcatc tgggacctc ctgcaataga 3060
tgttcagggg caaaagcctc tggagacagg cttggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga 3120
25 gacgggccgg tccagggcag ggggtggccag gcgggcggcc accctcacgc gcgcctctct 3180
30 ccacagacgt gtccgagtac agctgccgcg agctgcactt caccgctac gtgaccgatg 3240
ggccgtgccg cagcgccaag ccggtcaccg agctggtgtg ctccggccag tgcggcccg 3300
35 cggcctgct gcccaacgcc atcggccgcg gcaagtggtg gcgacctagt gggcccgact 3360
40 tccgctgcat ccccgaccgc taccgcgcg agcgcgtgca gctgctgtgt cccggtggtg 3420
aggcggccg cgcgcgcaag gtgcgcctgg tggcctegtg caagtgcaag cgcctcacc 3480
45 gcttcacaaa ccagtcggag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcgg ccgcagaagg 3540
50 gccggaagcc ggggccccgc gccyyaycy ccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg 3600
cctactagag cccgcccgcg ccctccccca ccggcgggcg ccccgccct gaaccgcgc 3660
55 cccacatttc tgcctctgc gcgtggtttg attgtttata tttcattgta aatgcctgca 3720
60
65

ES 2 272 093 T3

accagggca gggggctgag accttccagg ccctgaggaa tcccgggcgc cggcaaggcc 3780

5 cccctcagcc cgccagctga ggggtccac ggggcagggg aggggaattga gagtcacaga 3840

cactgagcca cgcagccccg cctctggggc cgcctacctt tgctgggtccc acttcagagg 3900

10 aggcagaaat ggaagcattt tcaccgccct ggggttttaa gggagcgggtg tgggagtggg 3960

15 aaagtccagg gactgggttaa gaaagttgga taagattccc ccttgcacct cgctgcccat 4020

cagaaagcct gaggcgtgcc cagagcacia gactgggggc aactgtagat gtggtttcta 4080

20 gtccctggctc tgccactaac ttgctgtgta accttgaact acacaattct ccttcgggac 4140

ctcaatttcc actttgtaaa atgaggggtgg aggtgggaat aggatctcga ggagactatt 4200

25 ggcatatgat tccaaggact ccagtgccctt ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga 4260

30 gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattg attcagtgcc aaggtcactt ccagaattca 4320

gagttgtgat gctctcttct gacagccaaa gatgaaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa 4380

35 agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgacaaact cctggaagaa gctatgctgc 4440

40 ttcccagcct ggcttccccg gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaaataa 4500

catcatccat tggggtagaa aaggagaggg tccgaggggtg gtgggagggga tagaaatcac 4560

45 atccgccccca acttcccaaa gagcagcatc cctccccga cccatagcca tgttttaag 4620

tcaccttccg aagagaagtg aaaggttcaa ggacactggc cttgcaggcc cgagggagca 4680

50 gccatcacia actcacagac cagcacatcc cttttgagac accgccttct gccaccact 4740

55 cacggacaCa tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc 4800

60

65

ES 2 272 093 T3

ttacactaaa agaataattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac 4860
5 tgcagagcat aatagctgcc acccaaaaat ctttttgaaa atcatttcca gacaacctct 4920
tactttctgt gtagttttta attgttaaaa aaaaaaagt ttaaacagaa gcacatgaca 4980
10 tatgaaagcc tgcaggactg gtcgtttttt tggcaattct tccacgtggg acttgtccac 5040
aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttattttct cacttaagtt 5100
15 atttatgcaa aagtttttct tgtagagaat gacaatgtta atattgcttt atgaattaac 5160
20 agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag 5220
gatgtggctc cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc 5280
25 tcttggtcac tagagctcca accttggaca cacctttgac tgctctctgg tggccttgt 5340
ggcaattatg tcttctttg aaaagtcatg tttatccctt cctttccaaa cccagaccgc 5400
30 atttcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tcttttagc agcctcccct 5460
35 ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcactc ccctgctcaa aagccttcca 5520
tagctcccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggccttctct 5580
40 gcttgaactc cacctcccac tccaccaagc ttctactga ctccaaatgg tcatgcagat 5640
45 ccctgcttcc ttagtttgcc atccacactt agcaccceca ataactaatc ctctttcttt 5700
aggattcaca ttacttgtca tctcttcccc laaccrtcca gagatgttcc aatctcccat 5760
50 gatccctctc tctctgagg ttecagcccc ttttgtctac accactactt tggttcctaa 5820
55 ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta 5880
60
65

ES 2 272 093 T3

ctggcataga caacacaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct 5940

5 tcttcgaagt gtggatttga tgcctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggcc 6000

agcctcctgc acttctctca aagtctcgcc tccccaaggt gtcttaatag tgctggatgc 6060

10 tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccetaaag ttactcttca gttgccttaa 6120

ggtagggatgg tcaactggaa agctttaaata taagtccagc ctaccttggg ggaacccacc 6180

15 cccacaaaga aagctgaggt ccctcctgat gacttgtcag ttaactacc aataaccac 6240

20 ttgaattaat catcatcatc aagtctttga taggtgtgag tgggtatcag tggccggctc 6300

cttctggggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagttagcc cctgcagaaa atccatgcat 6360

25 catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggtagga aacagagaca tcttccatcc 6420

30 ctgagaggca gtgcgggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgtgtt 6480

tgtttgtttg ttttgagaca gagtctcgct ctattgccca ggctggagtg cagtgtcaca 6540

35 atctcggtt actgcaactt ctgccttccc ggattcaagt gattctcctg cctcagcctc 6600

cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaattttg tattttgat 6660

40 agagacgggg tttcaccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct 6720

45 gcctgcctcg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccaca cccagccca 6780

ggttgggtgtt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaagtgtt tgcccacagc 6840

50 cataacttggg ctcagttctt tgcctacct ctcacttgag ctgcttagaa cctgggtgggc 6900

55 acatgggcaa taaccaggtc aactgtttt gtaccaagtg ttatgggaat ccaagatagg 6960

60

65

ES 2 272 093 T3

agtaatttgc tctgtggagg g gatgagga tagtggtag ggaaagcttc acaaagtggg 7020

5 tgttgcttag agattttcca ggtggagaag ggggcttcta ggcagaaggc atagcccaag 7080

caaagactgc aagtgc atg ctgctcatgg gtagaagaga atccaccatt cctcaacatg 7140

10 taccgagtcc ttgccatg caaggcaaca tgggggtacc aggaattcca agcaatgtcc 7200

15 aaacctaggg tctgctttct gggacctgaa gatacaggat ggatcagccc aggctgcaat 7260

cccattacca cgagggggaa aaaaacctga aggctaaatt gtaggtcggg ttagagggtta 7320

20 tttatggaaa gttatattct acctacatgg ggtctataag cctggcgcca atcagaaaag 7380

gaacaaacaa cagacctagc tgggaggggc agcattttgt tgtagggggc ggggcacatg 7440

25 ttctgggggt acagccagac tcagggcttg tattaatagt ctgagagtaa gacagacaga 7500

30 gggatagaag gaaataggtc cctttctctc tctctctctc tctctctctc actctctctc 7560

tctctcacac acacacacag acacacacac acgctctgta ggggtctact tatgctcaa 7620

35 gtacaaatca ggccacattt acacaaggag gtaaaggaaa agaacgttg aggagccaca 7680

ggaccccaaa attccctgtt ttccttgaat caggcaggac ttacgcagct gggaggggtg 7740

agagcctgca gaagccacct gcgagtaagc caagttcaga gtcacagaca ccaaagctg 7800

45 gtgccatgtc ccacaccgc ccacctcca cctgctcctt gacacagccc tgtgctccac 7860

aaccgggctc ccagatcatt gailalagui clygggctg caccgctctt cctgccacat 7920

ccccaccca ttcttggaac ctgccctctg tcttctcctt tgtccaaggg caggcaaggg 7980

55 ctcagctatt gggcagcttt gaccaacagc tgaggctcct tttgtggctg gagatgcagg 8040

60

65

ES 2 272 093 T3

aggcagggga atattcctct tagtcaatgc gaccatgtgc ctggtttgcc cagggtggtc 8100
tcgtttacac ctgtaggcca agcgtaatta ttaacagctc ccacttctac tctaaaaaat 8160
5 gaccaatct gggcagtaaa ttatatggtg cccatgctat taagagctgc aacttgctgg 8220
gcgtgggtggc tcacacctgt aatcccagta ctttgggacg tcaaggcggg tggatcacct 8280
10 gaggtcacga gttagagact ggcctggcca gcatggcaaa accccatctt tactaaaaat 8340
15 acaaaaatta gcaaggcatg gtggcatgca cctgtaatcc cagggtactcg ggaggctgag 8400
acaggagaat ggcttgaacc caggaggcag aggttgcagt gagccaagat tgtgccactg 8460
20 ccctccagcc ctggcaacag agcaagactt catctcaaaa gaaaaaggat actgtcaatc 8520
25 actgcaggaa gaaccaggt aatgaatgag gagaagagag gggctgagtc accatagtgg 8580
cagcaccgac tcctgcagga aaggcgagac actgggtcat ggggtactgaa ggggtgccctg 8640
30 aatgacgttc tgctttagag accgaacctg agccctgaaa gtgcatgcct gttcatgggt 8700
gagagactaa attcatcatt ccttggcagg tactgaatcc tttcttacgg ctgccctcca 8760
35 atgccaatt tcctacaat tgtctggggg gcctaagctt ctgccacca agagggccag 8820
40 agctggcagc gagcagctgc aggtaggaga gataggtacc cataagggag gtgggaaaga 8880
gagatggaag gagaggggtg cagagcacac acctccccctg cctgacaact tcctgagggc 8940
45 tgggtcatgcc agcagattta aggcggaggc aggggagatg gggcgggaga ggaagtgaaa 9000
aaggagaggg tggggatgga gaggaagaga gggatgatcat tcattcattc cattgctact 9060
50 gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctct gggcatgtgg ttgtaatctt 9120
ggagcctcat ggagctcaca gggagtgctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa 9180
60 ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctgggtg 9240
agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag 9300
65 c 9301

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo formado por:
- (a) una molécula de ácido nucleico aislada que comprende el SEQ ID NO. 1, 5, 9, 11, 13 o 15, o una secuencia complementaria de la misma;
 - 10 (b) una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida específicamente con la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas donde la hibridación se realiza en 5 x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C; y
 - (c) un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de unión al TGF-beta según (a) y (b);
- 15 donde el ácido nucleico no es el ácido nucleico de cualquiera de los números de acceso AC003098, AA393939 y AI113131 de la base de datos EMBL.
2. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 2.
- 20 3. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 6.
4. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 10.
- 25 5. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 12.
- 30 6. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 14.
7. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 16.
- 35 8. Un vector de expresión, que comprende un promotor conectado operablemente a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a TGF-beta, donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo formado por:
- 40 (a) una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15; y
 - (b) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas, donde la hibridación se realiza en 5x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C.
- 45 9. El vector de expresión según la reivindicación 8, donde dicho promotor se selecciona del grupo formado por el promotor I-E de CMV, el promotor temprano de SV40 y la LTR de MuLV.
10. El vector de expresión según la reivindicación 8, donde dicho promotor es un promotor específico de un tejido.
- 50 11. El vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la molécula de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 2, 6, 10, 12, 14 o 16.
12. Un método de producción de una proteína de unión a TGF-beta, que comprende cultivar una célula que contiene un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 en las condiciones y el tiempo suficiente para producir dicha proteína.
- 55 13. El método según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente la etapa de purificar dicha proteína.
14. Un vector viral capaz de dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a TGF-beta, donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo formado por:
- 60 (a) una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15; y
 - 65 (b) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas, donde la hibridación se realiza en 5x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C.

ES 2 272 093 T3

15. El vector viral según la reivindicación 14, donde dicho vector se selecciona del grupo formado por los vectores virales del herpes simplex, los vectores adenovirales, los vectores virales asociados con adenovirus y los vectores retrovirales.
- 5 16. El vector de expresión viral de la reivindicación 14 o 15, donde la molécula de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 2, 6, 10, 12, 14 o 16.
17. Una célula huésped que porta un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 y 14 a 16.
- 10 18. La célula huésped según la reivindicación 17, donde dicha célula se selecciona del grupo formado por una célula humana, una célula de perro, una célula de mono, una célula de rata y una célula de ratón.
19. Una proteína aislada, que comprende una proteína de unión a TGF-beta codificada por un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 15 20. Un anticuerpo o fragmento del mismo, donde el anticuerpo o fragmento se une a una proteína de unión a TGF-beta codificada por un ácido nucleico seleccionado del grupo formado por:
- 20 (a) una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15; y
- (b) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas, donde la hibridación se realiza en 5x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C;
- 25 donde el anticuerpo no se une a la proteína Dan o la proteína Gremlin.
21. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 20, donde el anticuerpo o fragmento se une a una proteína que comprende la proteína del SEQ ID NO. 2, 6, 10, 12 o 14.
- 30 22. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación 20 o 21, donde dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo monoclonal.
23. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación 22, donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento es un anticuerpo o fragmento de ratón o humano.
- 35 24. El fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, donde dicho fragmento se selecciona del grupo formado por $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab y Fv .
- 40 25. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24 que está humanizado.
26. El anticuerpo según la reivindicación 20 o 21 que es un anticuerpo policlonal.
27. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, donde el anticuerpo o fragmento se une a la proteína de unión a TGF-beta con una K_a mayor o igual a $10^7 M^{-1}$.
- 45 28. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 27 que tiene una K_a mayor o igual a $10^8 M^{-1}$.
29. Un método para producir un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales contra una proteína de unión a TGF-beta que comprende:
- 50 (i) inmunizar un roedor con una proteína de unión a TGF-beta como se define en la reivindicación 19 o una porción de semejante proteína;
- (ii) sacrificar el roedor y cosechar los nódulos de bazo y/o linfáticos del animal; y
- 55 (iii) fusionar las suspensiones de células de nódulos de bazo o linfáticos con células de mieloma para generar hibridomas.
30. El método de la reivindicación 29, donde el método comprende adicionalmente rastrear los hibridomas para identificar los hibridomas que pueden producir anticuerpos contra la proteína de unión a TGF-beta.
- 60 31. El método según la reivindicación 29 o 30, donde el roedor es una rata o ratón.
32. El método de la reivindicación 31, donde el ratón ha sido diseñado para producir anticuerpos humanos.
- 65 33. Una célula que produce un anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 28.
34. Una célula según la reivindicación 33 que es un hibridoma.

ES 2 272 093 T3

35. Un método para producir un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo contra una proteína de unión a TGF-beta que se define como en la reivindicación 22 que comprende aislar y purificar el anticuerpo o fragmento de un hibridoma como se define en la reivindicación 34 o manipular y re-expresar el ADN que codifica las regiones variables.

36. Una proteína de fusión que comprende un primer segmento polipeptídico que comprende una proteína de unión a TGF-beta o una porción de la misma de al menos 10 aminoácidos de longitud y un segundo segmento polipeptídico que comprende una proteína no de unión a TGF-beta, donde la proteína de unión a TGF-beta del primer segmento polipeptídico está codificada por una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por:

(a) una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15; y

(b) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas, donde la hibridación se realiza en 5x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C;

37. La proteína de fusión de la reivindicación 36, donde la proteína de unión a TGF-beta comprende la proteína del SEQ ID NO. 2, 6, 10, 12, 14 o 16.

38. La proteína de fusión según la reivindicación 36 o 37, donde dicho primer segmento polipeptídico tiene una longitud de al menos 20 aminoácidos.

39. La proteína de fusión según la reivindicación 38, donde dicho segmento polipeptídico tiene una longitud de al menos 50 aminoácidos.

40. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, donde dicho segundo polipéptido comprende múltiples restos aminoácido aniónicos.

41. Un oligonucleótido aislado que hibrida con una molécula de ácido nucleico según el SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, o su complemento, en condiciones muy restrictivas y que no es el ácido nucleico de cualquiera de los números de acceso AC003098, AA393939 y AII13131 de la base de datos EMBL, donde la hibridación se realiza en 5 x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55°C a 60°C.

42. Un oligonucleótido aislado según la reivindicación 41, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos.

43. El oligonucleótido aislado según la reivindicación 42, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de al menos 30 nucleótidos.

44. El oligonucleótido aislado según la reivindicación 43, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos.

45. El oligonucleótido aislado según la reivindicación 44, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de entre 50 y 100 nucleótidos.

46. Un par de cebadores que es uno de los siguientes pares de cebadores:

(i) los cebadores de las SEC ID NOS. 19 y 20;

(ii) los cebadores de las SEC ID NOS. 23 y 24;

(iii) los cebadores de las SEC ID NOS. 26 y 27; y

(iv) los cebadores de las SEC ID NOS. 28 y 29.

47. Una ribozima que escinde el ARN que codifica una proteína según la reivindicación 19, donde la ribozima comprende secuencias anti-sentido para reconocer el ARN que va a ser escindido y una actividad enzimática de escisión de ARN.

48. La ribozima según la reivindicación 47, donde dicha proteína comprende la proteína del SEQ ID NO. 2, 6, 10, 12, 14 o 16.

49. La ribozima según la reivindicación 47 o 48, donde dicha ribozima está compuesta por ácidos ribonucleicos.

50. La ribozima según la reivindicación 49, donde uno o más de dichos ácidos ribonucleicos son ácidos 2'-O-metilribonucleicos.

ES 2 272 093 T3

51. La ribozima según la reivindicación 47 o 48, donde dicha ribozima está compuesta por una mezcla de ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos.
52. La ribozima según la reivindicación 47 o 48, donde dicha ribozima está compuesta por ácidos nucleicos que tienen enlaces fosfotioato.
53. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una ribozima según la reivindicación 47.
54. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 53, donde el ácido nucleico es ADN o ADNc.
55. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 53 o 54, bajo el control de un promotor para transcribir el ácido nucleico.
56. Una célula huésped que comprende la ribozima de una cualquiera de las reivindicaciones 47 a 52.
57. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 55.
58. El vector de la reivindicación 57, donde el vector es un plásmido, un virus, un retrotransposón o un cósmido.
59. El vector de la reivindicación 58, donde dicho virus se selecciona del grupo formado por retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados.
60. Una célula huésped que contiene el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 59.
61. La célula huésped según la reivindicación 60, donde dicha célula huésped es transformada establemente con dicho vector.
62. La célula huésped según la reivindicación 60 o 61, donde la célula huésped es una célula humana.
63. Un método para producir una ribozima *in vitro* que comprende proporcionar ADN que codifica la ribozima según la reivindicación 47, bajo el control transcripcional de un promotor y transcribir el ADN para producir la ribozima.
64. El método de la reivindicación 63 que comprende adicionalmente purificar la ribozima.
65. Una ribozima según una cualquiera de las reivindicaciones 47 a 52 o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 28, para su uso en un método para incrementar la mineralización ósea en un animal de sangre caliente.
66. El uso de una ribozima según una cualquiera de las reivindicaciones 47 a 52 o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 28 en la fabricación de un medicamento para incrementar la mineralización ósea en un animal de sangre caliente.
67. El uso según la reivindicación 66, donde el animal de sangre caliente tiene osteopenia.
68. El uso según la reivindicación 66, donde la osteopenia está causada por un estado anémico, esteroides, heparina, un trastorno de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia en calcio, osteoporosis idiopática, osteopenia y osteoporosis congénita, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, senectud, estado post-menopáusico, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes melitus, hipertiroidismo, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional transitoria u osteomalacia.
69. El uso según la reivindicación 66, donde el animal tiene osteoporosis.
70. El uso según la reivindicación 66, donde el animal tiene acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, enfermedad de Marfan, exotosis hereditaria múltiple, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoikilosis lesiones escleróticas, fracturas, enfermedad periodontal, pseudoartrosis u osteomielitis pirogénica.
71. Una composición farmacéutica, que comprende una ribozima según una cualquiera de las reivindicaciones 47 a 52 o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 28 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
72. Un método para detectar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a TGF-beta, que comprende incubar un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 45 en condiciones muy restrictivas y detectar la hibridación de dicho oligonucleótido.
73. El método según la reivindicación 72, donde dicho oligonucleótido está marcado.

ES 2 272 093 T3

74. El método según la reivindicación 72 o 73, donde dicho oligonucleótido está unido a un soporte sólido.

75. Un método para detectar una proteína de unión a TGF-beta, que comprende incubar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 28 en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo o fragmento se una a una proteína de unión a TGF-beta, y detectar dicha unión.

76. El método según la reivindicación 75, donde dicho anticuerpo está unido a un soporte sólido.

77. El método según la reivindicación 75 o 76, donde dicho anticuerpo está marcado.

78. El método según la reivindicación 77, donde dicho anticuerpo está marcado con un marcador seleccionado del grupo formado por enzimas, proteínas fluorescentes y radioisótopos.

79. Un animal transgénico cuyas células germinales y células somáticas contienen una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a TGF-beta, donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo formado por:

(a) una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15; y

(b) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas, donde la hibridación se realiza en 5x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C;

donde la molécula de ácido nucleico está conectada operablemente a un promotor eficaz para la expresión de dicho gen, siendo introducido dicho gen en dicho animal, o un ancestro de dicho animal, en una fase embrionaria, con la condición de que dicho animal no sea humano.

80. El animal transgénico según la reivindicación 79, donde la proteína de unión a TGF-beta es expresada a partir de un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

81. Un animal transgénico según la reivindicación 79 u 80, donde la proteína de unión a TGF-beta comprende la proteína del SEQ ID NO. 2, 6, 10, 12, 14 o 16.

82. Un animal con un gen inactivado transgénico, que comprende un animal cuyas células germinales y células somáticas comprenden una desorganización de al menos un alelo de una molécula de ácido nucleico endógena que codifica una proteína de unión a TGF-beta, seleccionándose la molécula de ácido nucleico endógena del grupo formado por:

(a) una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15; y

(b) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas, donde la hibridación se realiza en 5x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C;

donde dicha desorganización evita la transcripción del ARN mensajero de dicho alelo en comparación con un animal sin dicha desorganización, con la condición de que dicho animal no sea humano.

83. El animal transgénico según la reivindicación 82, donde dicha desorganización es una delección, sustitución o inserción de ácido nucleico.

84. El animal transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 80 a 83, donde el animal se selecciona del grupo formado por un ratón, una rata y un perro.

85. Un método para determinar si una molécula candidato es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprende:

(a) mezclar una o más molécula candidato con proteína de unión a TGF-beta codificada por una molécula de ácido nucleico y un miembro seleccionado de la familia de proteínas del TGF-beta donde el ácido nucleico se selecciona del grupo formado por:

(i) una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO. 1, 5, 9, 11, 13, o 15; y

(ii) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas, donde la hibridación se realiza en 5x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche de 55 a 60°C; y

(b) determinar si la molécula candidato altera la señalización del miembro de la familia del TGF- beta, o altera la unión de la proteína de unión a TGF-beta al miembro de la familia del TGF- beta.

ES 2 272 093 T3

86. El método según la reivindicación 85, donde dicho miembro de la familia de proteínas del TGF-beta es BMP6.

87. Un método para determinar si una molécula candidato es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprende: determinar si una molécula candidato inhibe la unión de una proteína de unión a TGF-beta de la reivindicación 19 al hueso, o un análogo del mismo.

88. El método según la reivindicación 87, donde dicho análogo de hueso es la hidroxiapatita.

89. Un estuche para la detección de la expresión génica de la proteína de unión a TGF-beta, que comprende un recipiente que comprende una molécula de ácido nucleico, donde dicha molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo formado por (a) una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO. 1, 5, 9, 11, 13, o 15; (b) una molécula de ácido nucleico que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a); y (c) una molécula de ácido nucleico que es un fragmento de (a) o (b) de al menos 50 nucleótidos de longitud, donde el ácido nucleico no es el ácido nucleico de cualquiera de los números de acceso AC003098, AA393939 y AI113131 de la base de datos EMBL.

90. Un estuche para la detección de la proteína de unión a TGF-beta, que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 28.

91. Un oligonucleótido antisentido, que comprende una molécula de ácido nucleico que hibrida con una molécula de ácido nucleico según el SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, o su complemento, y donde dicho oligonucleótido inhibe la expresión de la proteína de unión a TGF-beta según la reivindicación 19, donde el oligonucleótido antisentido no es el ácido nucleico de cualquiera de los números de acceso AC003098, AA393939 y AI113131 de la base de datos EMBL.

92. El oligonucleótido según la reivindicación 91, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de 15 nucleótidos.

93. El oligonucleótido según la reivindicación 92, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de 20 nucleótidos.

94. El oligonucleótido según la reivindicación 91, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de 50 nucleótidos.

95. El oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 91 a 94, donde dicho oligonucleótido consta de uno o más análogos de ácido nucleico.

96. El oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 91 a 95, donde dicho oligonucleótido consta de uno o más ácidos ribonucleicos.

97. El oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 91 a 95, donde dicho oligonucleótido consta de uno o más ácidos desoxirribonucleicos.

98. El oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 91 a 95, donde dicha secuencia de oligonucleótidos consta de uno o más enlaces covalentes modificados.

99. El oligonucleótido según la reivindicación 98, donde dicho enlace covalente modificado se selecciona del grupo formado por un enlace fosforioato, un enlace fosfotriéster, un enlace metilfosfonato, un enlace metileno(metilimino), un enlace morfolino, un enlace amido, un enlace poliamido, un enlace interazúcar alquílico de cadena corta, un enlace interazúcar cicloalquílico, un enlace interazúcar heteroatómico de cadena corta y un enlace interazúcar heterocíclico.

55

60

65

Esqueleto de Cisteína Común

1				50	
human_gremlin.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_cerberus.pro	MHLLLQLLV	LLPLGKTTRH	QDGRQNOSSL	SPVLLPRNQR	ELPTGNHEEA
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_beer.pro	-----	-----	-----	-----	-----
	51				100
human_gremlin.pro	-----	-----M	SRTAYTVGAL	LLLLGTLPLA	AEGKKKSQSG
human_cerberus.pro	EEKPDLFVAV	PHLVAT.SPA	GEGQRQREKM	LSRFGRFWKK	PEREMHPSRD
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_beer.pro	-----	-----	-----	----MQLPLA	LCLVCLLVHT
	101				150
human_gremlin.pro	AI.PPPDKAQ	HNDSEQTQSP	QQGSRNRGR	GQGRGTAMPG	EEVLESSQEA
human_cerberus.pro	SDSEFPFPGT	QSLIQPID.G	MKMEKSPLRE	EAKKFWHHFM	FRKTPASQGV
human_dan.pro	-----	-----	-----	MLRVLVGAVL	PAMLLAAPP
human_beer.pro	AFRVVEGQGW	QAFKNDATEI	IPELGEYPEP	PPELENNKTM	NRAENGGRPP
	151	↓	↓	↓	↓
human_gremlin.pro	LHVTERKYLK	RDWCKTQPLK	QTIHEEGCNS	RTIINRF.CY	GQCNSFYIPR
human_cerberus.pro	ILPIKSHEVH	WETCRTVPFS	QTITHEGCEK	VVVQNNL.CF	GKCGSVHFP.
human_dan.pro	INKLALFPDK	SAWCEAKNIT	QIVGHSGCEA	KSIGNRA.CL	GQCFYSYVFN
human_beer.pro	HHPFETKDVS	EYSCRELHFT	RYVTDGPCRS	AKPVTELVCS	GQCGPARLLP
	201	↓	↓		250
human_gremlin.pro	HIRKEEGSFQ	SCSF...CKP	KKFTTMMVTL	NCPQLQPTK	K.KRVTRVKQ
human_cerberus.pro	..GAAQHSHT	SCSH...CLP	AKFTTMHLPL	NCTELSSVIK	V...VMLVEE
human_dan.pro	TFPQSTESLV	HCDS...CMP	AQSMWEIVTL	ECPGHVEVPR	VDKLVKILH
human_beer.pro	NAIGRGKWR	PSGPDFRCIP	DRYRAQRVQL	LCPGGEAPRA	RKVRVAS..
	↓↓				300
human_gremlin.pro	CRC.ISIDLD	-----	-----	-----	-----
human_cerberus.pro	CQCKVTEHE	DGHILHAGSQ	DSFIPGVSA-	-----	-----
human_dan.pro	CSCQACGKEP	SHEGLSVYVQ	GEDGPGSQPG	THPHPHPHPH	PGGQTPEPED
human_beer.pro	CKCKRLTRFH	NQSELKDFGT	EAARPQKGRK	PRPRARSAKA	NQAELENAY-
	301	314			
human_gremlin.pro	-----	-----			
human_cerberus.pro	-----	-----			
human_dan.pro	PPGAPHTEEE	GAED			
human_beer.pro	-----	-----			

Figura 1

Expresión del Gen Beer Humano por RT-PCR

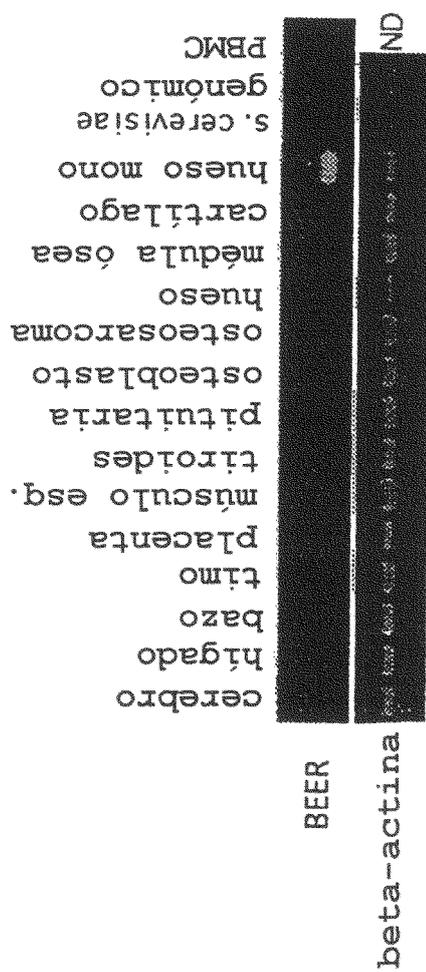


Fig. 2

Hibridación In Situ de ARN de Secciones de Embrión de Ratón

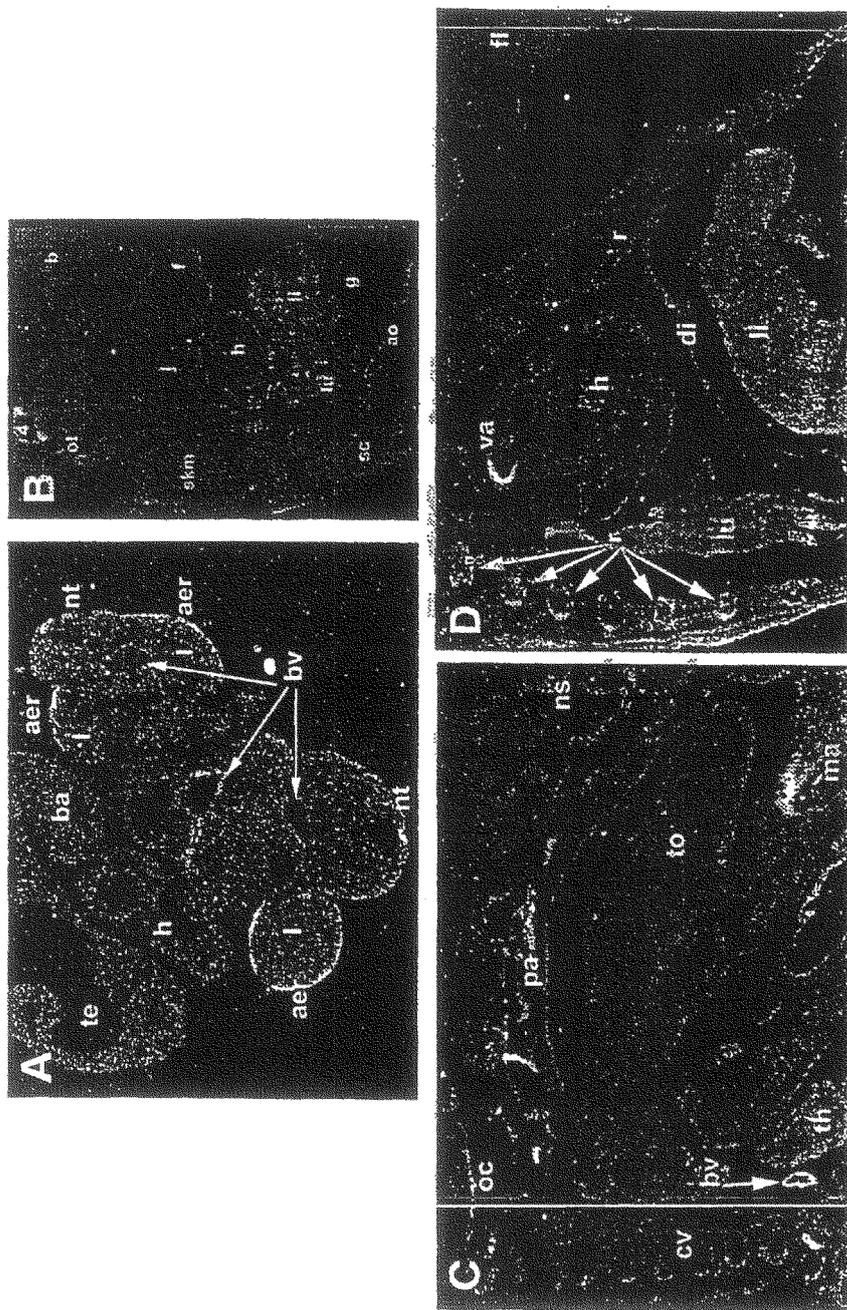


Fig. 3

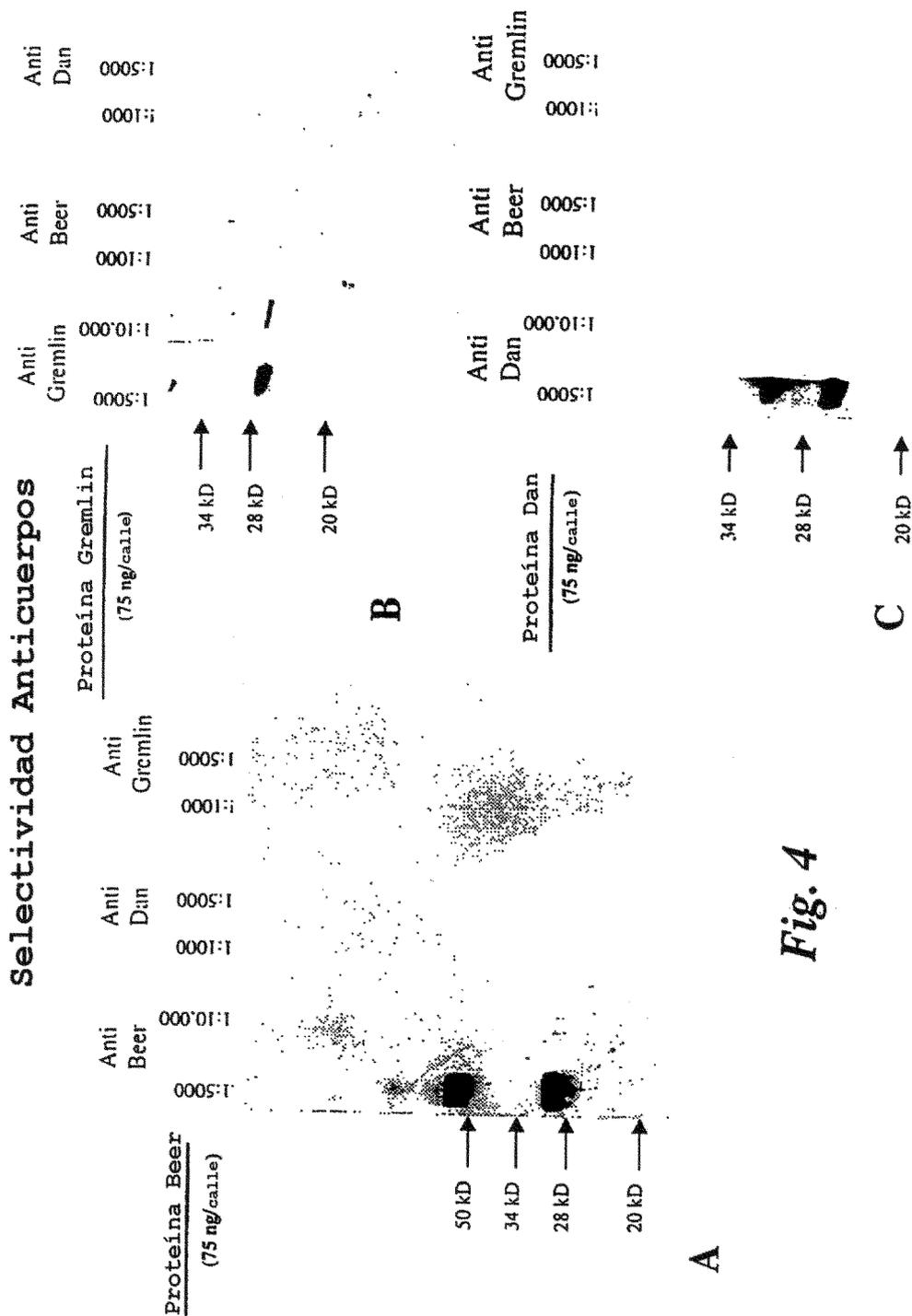


Fig. 4

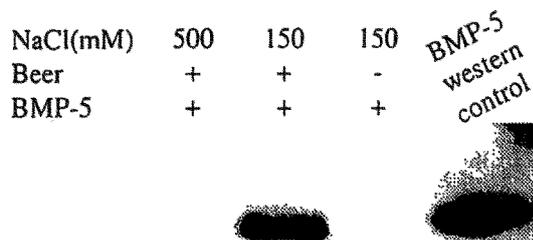
Caracterización de la Constante de Disociación de BMP-5/Beer

,75 1,5 7,5 15 30 60 120 nM BMP-5



*Inmunoprecipitación Anti-FLAG *Transferencia
western anti-BMP-5

Desorganización Iónica de la Unión BMP-5/Beer



* Inmunoprecipitación anti-FLAG
* Western anti-BMP-5

Fig. 6

ES 2 272 093 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Brunkow, Mary E.
Galas, David J.
5 Kovacevich, Brian
Mulligan, John T.
Paeper, Bryan W.
Van Ness, Jeffrey
Winkler, David G.
10

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA INCREMENTAR LA MINERALIZACIÓN ÓSEA

<130> 240083.508
15

<140> US
<141> 1999-11-24

20 <160> 41

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

25 <210> 1
<211> 2301
<212> ADN
<213> *Homo sapien*
30

<400> 1

35	agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctctctggc tggtagcatg cagctcccac	60
	tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg	120
	ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcgga gagtaccccg	180
	agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagAAC ggagggcggc	240
40	ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact	300
	tcaccgccta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgcaa gccggtcacc gagctggtgt	360

45

50

55

60

65

ES 2 272 093 T3

```

gctccggcca gtgcgcccg gcgcgccctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtggc 420
ggcgacctag tgggccccgac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc 480
5 agctgctgtg tccccgggtgg gaggcgccgc gcgcgcgcaa ggtgcgccctg gtggcctcgt 540
gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttccaca accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg 600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccg cgccccggagc gccaaagcca 660
10 accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccccccg cccctcccc accggcgggc 720
gccccggccc tgaaccccgcg cccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat 780
atctcattgt aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gacctccag gccctgagga 840
15 atccccggcg ccggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg 900
gaggaattg agagtcacag aactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct 960
ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccgccc tggggtttta 1020
agggagcggc gtgggagtg gaaagtccag ggactgggta agaaagtgg ataagattcc 1080
20 cccttgacc tcgctgcccc tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg 1140
caactgtaga tgtggtttct agtccctggc ctgccactaa cttgctgtgt aacctgaa 1200
tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgaggggtg gaggtgggaa 1260
25 taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg 1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc 1380
caaggtcact tccagaattc agagtgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa 1440
30 caaacagaaa aaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac 1500
tcctggaaga agctatgctg ctcccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctccac 1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggc 1620
35 ggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat ccctccccg 1680
acccatagcc atgttttaaa gtcaccttcc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg 1740
ccttgcaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga 1800
40 caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc tcttactgc 1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt 1920
gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc caccacaaaa tcttttgaa 1980
aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgttaaa aaaaaaagt 2040
45 tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160
atctatcttc tcacttaagt tatttatgca aaagtctttc ttgtagagaa tgacaatgct 2220
50 aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc tccagagtc cagagacatc gttataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

```

```

55 <210> 2
    <211> 213
    <212> PRT
60 <213> Homo sapien

```

65

ES 2 272 093 T3

<400> 2

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

<210> 2

55 <211> 2301

<212> ADN

<213> *Homo sapien*

60

65

ES 2 272 093 T3

<400> 3

	agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctccctctggc tggtagcatg cagctcccac	60
5	tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggctagg	120
	ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcggg gagtaccocg	180
	agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagAAC ggagggcggc	240
10	ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact	300
	tcaccgccta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt	360
	gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtgg	420
	ggcgacctag tgggcccgcac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc	480
15	agctgctgtg tcccgggtgt gaggcgccgc gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt	540
	gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttccaca accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg	600
	aggccgctcg gccgcagaag ggcgggaagc gcgcggcccg cgcgcggagc gccaaagcca	660
20	accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgcgccg gccctcccc accggcgggc	720
	gccccggccc tgaaccgcg ccccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat	780
	atctcattgt aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gaccttccag gccctgagga	840
25	atcccggcgc ccggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg	900
	gagggAattg agagtCACag aactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct	960
	ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggAagcatt ttcaccgcc tggggtttta	1020
	agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactggtta agaaagtTgg ataagattcc	1080
30	cccttgCacc tcgctgcccA tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg	1140
	caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac	1200
	tacacaattc tccctcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgaggggt gaggtgggaa	1260
35	taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgCct tttgaatggg	1320
	cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagTgc	1380
	caaggtcact tccagaattc agagtTgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaa	1440
40	caaacagaaa aaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac	1500
	tccTggaaga agctatgctg cttcccagcc tggttcccc ggatgtttgg ctacctccac	1560
	ccctccatct caaagaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggt	1620
45	ggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aactttccaa ayaycaycal ccccccccy	1680
	acccatagcc atgttttaaA gtcaccttc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg	1740
	ccttgCaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc cttttgaga	1800
	caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc	1860
50	tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt	1920
	gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaa tctttttgaa	1980
55	aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgttaaa aaaaaaagt	2040
	tttaaAcaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc	2100
	ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat	2160
60	atatttttc tcacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatgtt	2220
	aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc tccagagtc cagagacatt gttAataaag	2280
	acaatgaatc atgaccgaaa g	2301

65

ES 2 272 093 T3

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

5 <213> *Homo sapien*

<400> 4

10 Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
 1 5 10 15
 Ala Phe Arg Val Val Glu Gly
 20

15 <210> 5

<211> 2301

<212> ADN

20 <213> *Homo sapien*

<400> 5

25 agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctctctggc tggtagcatg cagctcccac 60
 tggccctgtg tctcatctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg 120
 ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aatcatccg cgagctcggg gagtaccacc 180
 agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagaac ggagggcggc 240
 30 ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcaact 300
 tcaccgccta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt 360
 gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtggg 420
 35 ggcgacctag tgggcccga cttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc 480
 agctgctgtg tcccgggtgt gaggcgccgc gcgcgcgcaa ggtgcccctg gtggcctcgt 540
 gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttcaca accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg 600
 40 aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccg cgcgccgagc gccaaagcca 660
 accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgccccg gccctcccc accggcgggc 720

45

50

55

60

65

ES 2 272 093 T3

	gccccggccc tgaacccgcg cccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat	780
	atcccatlgt aaatgcctgc aacccagggc agggggctga gaccttccag gccctgagga	840
5	atccccggcg cgggcaaggc ccccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg	900
	gaggggaattg agagtcaacag aactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct	960
	ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tgggaagcatt ttcaccgccc tggggtttta	1020
10	agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactggtta agaaagtgg ataagattcc	1080
	cccttgcacc tcgctgcccc tcagaaagcc tgagggctgc ccagagcaca agactggggg	1140
	caactgtaga tgtggtttct agtccctggct ctgccactaa cttgctgtgt aacctggaac	1200
15	tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgagggtg gaggtgggaa	1260
	taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg	1320
	cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc	1380
	caaggtcact tccagaattc agagttgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa	1440
20	caaacagaaa aaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac	1500
	tcctggaaga agctatgctg cttcccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctcac	1560
	ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgaggg	1620
25	ggtagggagg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat ccctccccg	1680
	acctatagcc atgttttaaa gtcaccttcc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg	1740
	ccttgcaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga	1800
30	caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc	1860
	tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt	1920
	gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tctttttgaa	1980
	aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgttaa aaaaaaagt	2040
35	tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc	2100
	ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat	2160
	atatttttc tcacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatggt	2220
40	aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag	2280
	acaatgaatc atgaccgaaa g	2301

45 <210> 6
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Homo sapien*

50

55

60

65

ES 2 272 093 T3

<400> 6

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

55 <210> 7

<211> 2301

<212> ADN

<213> *Homo sapien*

60

65

ES 2 272 093 T3

<400> 7

	agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctctctctggc tgggtaccatg cagctcccccac	60
5	tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagccct ccgtgtagtg gagggccagg	120
	ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aatcatccg cgagctcggg gagtaccctcg	180
	agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggccggagaac ggagggcggc	240
10	ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact	300
	tcacccgcta cgtgaccgat gggcctgtgc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt	360
	gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tggccaacgc catcggccgc ggcaagtgg	420
15	ggcgacctag tgggcccgcac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc	480
	agctgctgtg tcccgggtgt gaggcgccgc gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt	540
	gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttcacaca accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg	600
20	aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccc cgcccggagc gccaaagcca	660
	accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgcccgc gccctcccc accggcgggc	720
	gccccggccc tgaacccgcg ccccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtrttat	780
25	atctcattgt aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gaccttccag gccctgagga	840
	atccccggcg ccggcaaggc ccccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg	900
	gagggcaattg agagtcacag aacttgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct	960
	ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccgccc tgggggtttta	1020
30	agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactggtta agaaagtgg ataagattcc	1080
	cccttgccacc tcgctgcccc tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg	1140
	caactgtaga tgtgggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac	1200
35	tacacaatc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgagggg gaggtgggaa	1260
	taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg	1320
	cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc	1380
40	caaggctcact tccagaatc agagttgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaa	1440
	caaacagaaa aaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac	1500
	tcttggaaga agctatgctg ctccccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctccac	1560
45	ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgaggg	1620
	ggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat ccctccccg	1680
	acccatagcc atgttttaaa gtcaccttc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg	1740
	ccttgccaggc ccgaggggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga	1800
50	caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc	1860
	tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt	1920
	gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tctttttgaa	1980
55	aatcatttcc agacaacctc ttacttctctg tctagttttt aattgtttaa aaaaaaagt	2040
	tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc	2100
	ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaagaggt taagttacat	2160
60	atltattttc tcaactaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatggt	2220
	aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc tccagagtc cagagacatt gtttaataaag	2280
	acaatgaatc atgaccgaaa g	2301

65

ES 2 272 093 T3

<210> 8

<211> 213

<212> PRT

5 <213> *Homo sapien*

<400> 8

10

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr

1 5 10 15

15

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp

20 25 30

Ala Thr Glu Ile Ile Arg Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro

35 40 45

20

Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg

50 55 60

25

Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys

65 70 75 80

Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser

85 90 95

30

Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala

100 105 110

35

Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser

115 120 125

Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val

130 135 140

40

Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg

145 150 155 160

45

Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln

165 170 175

50

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly

180 185 190

Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu

195 200 205

55

Leu Glu Asn Ala Tyr

210

60

<210> 9

<211> 642

<212> ADN

65 <213> *Cercopithecus pygerythrus*

ES 2 272 093 T3

<400> 9

```

5   atgcagctcc cactggccct gtgtcttgtc tgcctgctgg tacacgcagc cttccgtgta    60
   gtggagggcc aggggtggca ggccttcaag aatgatgcca cggaaatcat ccccgagctc    120
   ggagagtacc ccgagcctcc accggagctg gagaacaaca agaccatgaa ccgggcggag    180
10  aatggagggc ggcctccccca ccacccttt gagaccaaaag acgtgtccga gtacagctgc    240
   cgagagctgc acttcacccg ctacgtgacc gatgggcccgt gccgcagcgc caagccagtc    300
   accgagttgg tgtgctccgg ccagtgcggc ccggcacgcc tgctgcccga cgccatcggc    360
   cgcggaagt ggtggcggcc gagtggggcc gacttccgct gcatccccga ccgctaccgc    420
15  gcgcagcgtg tgcagctgct gtgtcccggg ggtgccgcgc cgcgcgcgcg caaggtgcgc    480
   ctggtggcct cgtgcaagtg caagcgctc acccgcttcc acaaccagtc ggagctcaag    540
   gacttcggtc ccgagggcgc tcggccgcag aaggggcggga agccgcggcc ccgcgcccgg    600
20  ggggccaag ccaatcaggc cgagctggag aacgcctact ag                                642

```

<210> 10

25 <211> 213

<212> PRT

<213> *Cercopithecus pygerythrus*

30 <400> 10

```

35  Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Ala
   1           5           10           15
   Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
           20           25           30
40  Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
           35           40           45
   Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
   50           55           60
   Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
   65           70           75           80
   Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
           85           90           95

```

55

60

65

ES 2 272 093 T3

Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
 100 105 110
 5 Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
 115 120 125
 10 Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
 130 135 140
 15 Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
 145 150 155 160
 20 Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
 165 170 175
 25 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
 180 185 190
 Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
 195 200 205
 30 Leu Glu Asn Ala Tyr
 210

30 <210> 11
 <211> 638
 <212> ADN
 35 <213> *Mus musculus*
 <400> 11

40 atgcagccct cactagcccc gtgcctcatc tgcctacttg tgcacgctgc cttctgtgct 60
 gtggagggcc aggggtggca agccttcagg aatgatgcca cagaggtcat cccagggctt 120
 ggagagtacc ccgagcctcc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatgga 180
 45 ggacagacct cccaccatcc ctatgacgcc aaaggtgtgt ccgagtacag ctgccgagag 240
 ctgcactaca cccgcttcc gacagacggc ccatgccgca gcgccaagcc ggtcaccgag 300
 ttggtgtgct cggccagtg cggccccgcg cggtgctgc ccaacgcat cgggcgctg 360
 50 aagtgggtggc gccgaacgg accggatttc cgctgcatcc cggatcgcta ccgcgcgag 420
 cgggtgcagc tgctgtgccc cggggcgcg gcgcccgcgt cgcgcaaggt gcgtctggtg 480
 gcctcgtgca agtgcaagcg cctcaccgcg ttcacaacc agtcggagct caaggacttc 540
 55 gggccggaga ccgcgcgggc gcagaagggc cgcaagccgc ggcccggcgc cgggggagcc 600
 aaagccaacc aggcggagct ggagaacgcc tactagag 638

60 <210> 12
 <211> 211
 <212> PRT
 65 <213> *Mus musculus*

ES 2 272 093 T3

<400> 12

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

55 <210> 13
<211> 674
<212> ADN
<213> *Rattus norvegicus*

60

65

ES 2 272 093 T3

<400> 13

```

5      gaggaccgag tgcccttcct cttctggca ccatgcagct ctactagcc ccttgccttg      60
      cctgcctgct tgtacatgca gccttcgttg ctgtggagag ccaggggtgg caagccttca      120
      agaatgatgc cacagaaatc atcccgggac tcagagagta cccagagcct cctcaggaac      180
      tagagaacaa ccagaccatg aaccgggccc agaacggagg cagaccccc caccatcctt      240
10     atgacaccaa agacgtgtcc gactacagct gccgcgagct gactacacc cgcttcgtga      300
      ccgacggccc gtgccgcagt gccaagccgg tcaccgagtt ggtgtgctcg ggccagtgcg      360
      gccccgcgcg gctgctgccc aacgccatcg ggcgcgtgaa gtggtggcgc ccgaacggac      420
15     ccgacttcg ctgcatcccg gatcgctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg ctgtgccccg      480
      gcggcgcggc gccgcgctcg cgcaaggtgc gtctggtggc ctctgcaag tgcaagcggc      540
      tcaccgcgtt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg acctgagacc gcgcggccgc      600
20     agaagggctc caagccgcgg ccccgcccc ggggagccaa agccaaccag gcggagctgg      660
      agaacgcta ctag                                     674

```

25 <210> 14
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 30
 <400> 14

```

35     Met Gln Leu Ser Leu Ala Pro Cys Leu Ala Cys Leu Leu Val His Ala
      1           5           10           15
      Ala Phe Val Ala Val Glu Ser Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
40           20           25           30
      Ala Thr Glu Ile Ile Pro Gly Leu Arg Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Gln
      35           40           45
45     Glu Leu Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
      50           55           60
      Pro Pro His His Pro Tyr Asp Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
50     65           70           75           80
      Arg Glu Leu His Tyr Thr Arg Phe Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
      85           90           95
55     Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala

```

60

65

ES 2 272 093 T3

	100		105		110	
5	Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn					
	115		120		125	
	Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val					
10	130		135		140	
	Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg					
	145		150		155	160
15	Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln					
	165		170		175	
	Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly					
20	180		185		190	
	Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu					
	195		200		205	
25	Leu Glu Asn Ala Tyr					
	210					

30

<210> 15

<211> 2301

35

<212> ADN

<213> *Homo sapien*

<400> 15

40

agaatgatgc cacagaaatc atccccgagc tgggcgagta ccccgagcct ctgccagagc	60
tgaacaacaa gaccatgaac cgggcggaga acggagggag acctccccac caccctttg	120
agaccaaaga cgcctccgag tacagctgcc gggagctgca cttcaccgcg tacgtgaccg	180
atgggcccgtg ccgcagcgcc aagccggtea ccgagctggt gtgctcgggc cagtgcggcc	240
cggcgcgcct gctgcccac gccatcggcc gcggcaagtg gtggcgccca agcgggcccg	300
acttccgctg catccccgac cgctaccgcg cgagcgggt gcagctgttg tgtcctggcg	360
gcgcggcgcc gcgcgcgcgc aaggtgcgcc tggtgccctc gtgcaagtgc aagcgctca	420
ctcgttcca caaccagtcc gagctcaagg acttcgggccc cgaggccgcg cggccgcaaa	480
cgggccqaaa actgcggccc cgcgcgggg gacccaaagc cagccgggccc ga	542

55

<210> 16

<211> 176

60

<212> PRT

<213> *Bos torus*

65

ES 2 272 093 T3

<400> 16

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

<210> 17

<211> 35828

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> rasgos_misc

<222> (1)...(35828)

<223> n=A,T,C o G

55

60

65

ES 2 272 093 T3

<400> 17

5 cgcgttttgg tgagcagcaa tattgcgctt cgatgagcct tggcgttgag attgatacct 60
ctgctgcaca aaaggcaatc gaccgagctg gaccagcgca ttcgtgacac cgtctccttc 120
gaacttattc gcaatggagt gtcattcatc aaggacngcc tgatcgcaa tggtgctatc 180
10 caccgagcgg caatcgaaaa cctcagccg gtgaccaata tctacaacat cagccttggg 240
atcctgcgtg atgagccagc gcagaacaag gtaaccgtca gtgccgataa gttcaaagtt 300
aaacctgggtg ttgatacca cttgaaacg ttgatcgaaa acgcgctgaa aaacgctgct 360
gaatgtgagg cgctggatgt cacaaagcaa atggcagcag acaagaaagc gatggatgaa 420
15 ctggcttctt atgtccgcac ggccatcatg atggaatgtt tccccggtgg tgttatctgg 480
cagcagtgcc gtcgatagta tgcaattgat aattattatc atttgcgggt cctttccggc 540
gatccgctt gttacggggc ggcgacctcg cgggttttcg ctatttatga aaattttccg 600
20 gtttaaggcg tttccgttct tcttcgtcat aacttaatgt ttttatttaa aataccctct 660
gaaaagaaag gaaacgacag gtgctgaaag cgagcttttt ggcctctgtc gtttcctttc 720
tctgtttttg tccgtggaat gaacaatgga agtcaacaaa aagcagagct tatcgatgat 780
25 aagcggtcaa acatgagaat tcgcggccgc ataatacgac tcactatagg gatcgacgcc 840
tactccccgc gcatgaagcg gaggagctgg actccgcctg cccagagacg ccccccaacc 900
cccaaagtgc ctgacctcag cctctaccag ctctggcttg ggcttggggc ggggtcaaggc 960
30 taccacgttc tcttaacagg tggctgggct gtctcttggc cgcgcgtcat gtgacagctg 1020
cctagtctctg cagtgaggtc accgtggaat gtctgccttc gttgccatgg caacgggatg 1080
acgttacaat ctgggtgtgg agcttttctt gtccgtgtca ggaaatccaa ataccctaaa 1140
35 ataccctaga agaggaagta gctgagccaa ggctttcctg gcttctccag ataaagtttg 1200
acttagatgg aaaaaacaa aatgataaag acccgagcca tctgaaaatt cctcctaatt 1260
gcaccactag gaaatgtgta tattattgag ctcgatgtg ttcttatttt aaaaagaaaa 1320
40 ctttagtcat gttattaata agaatttctc agcagtggga gagaaccaat attaacacca 1380
agataaaagt tggcatgatc cacattgcag gaagatccac gttgggtttt catgaatgtg 1440
aagaccccat ttattaaagt cctaagctct gtttttgac actaggaagc gatggccggg 1500
atggctgagg ggctgtaagg atctttcaat gtcttacatg tgtgtttcct gtccctgcacc 1560
45 taggacctgc tgcctagcct gcagcagagc cagaggggtt tcacatgatt agtctcagac 1620
acttgggggc aggttgcatg tactgcatcg ctattttcca tacggagcac ctactatgtg 1680
tcaaacacca tatggtgttc actcttcaga acgggtgggtg tcatcatggt gcaatttgctg 1740
50 acggttggat tgggtgtaga gagctgagat atatggacgc actcttcagc attctgtcaa 1800
cgtggctqtg cattcttctt cctgagcaag tgggtaaca gactcacagg gtcagcctcc 1860
agctcagtcg ctgcatagtc ttagggaaac tctcccagtc ctccctacct caactatcca 1920
55 agaagccagg gggcttggcg gtctcaggag cctgcttctt gggggacagg ttgttgagtt 1980
ttatctgcag taggttgctt aggcatagtg tcaggactga tggctgcctt ggagaacaca 2040
tcctttgccc tctatgcaaa tctgaccttg acatgggggc gctgctcagc tgggaggatc 2100
60 aactgcatac ctaaagccaa gcctaaagct tcttcgtcca cctgaaactc ctggaccaag 2160

65

ES 2 272 093 T3

5 gggcttccgg cacatcctct caggccagtg agggagtctg tgtgagctgc actttccaat 2220
 cttagggcgt gagaggcaga gggaggtggg ggcagagcct tgcagctctt tcctcccatc 2280
 tggacagcgc tctggctcag cagcccatat gagcacaggc acatccccac cccacccccca 2340
 cctttcctgt cctgcagaat ttaggtctctg ttcacggggg gggggggggg ggggcagtcc 2400
 tatectctct taggtagaca ggactctgca ggagacactg ctttctaaga tactgcagtt 2460
 10 taaatttggg tgttgtgagg ggaaagcgaa gggcctcttt gaccattcag tcaaggtagc 2520
 ttctaactcc catcgtattg gggggctact ctagtctag acattgcaga gagcctcaga 2580
 actgtagtta ccagtgtggt aggattgatc cttcaggggag cctgacatgt gacagttcca 2640
 15 ttcttcaccc agtcaccgaa catttattca gtacctacc cgtaacaggc accgtagcag 2700
 gtactgaggg acggaccact caaagaactg acagaccgaa gccttggaa ataaacacca 2760
 aagcatcagg ctctgccaac agaacactct ttaacactca ggcccttta cactcaggac 2820
 20 cccaccccc accccaagca gttggcactg ctatccacat tttacagaga ggaaaaacta 2880
 ggcacaggac gatataagtg gcttgcttaa gcttgtctgc atggtaaag gacgggctgg 2940
 attgagaccc agacattcca actctagggg ctattttct ttttctcgt tgttcgaatc 3000
 tgggtcttac tgggtaaact caggctagcc tcacactcat atccttctcc catggcttac 3060
 25 gagtctagg attccagggt tgtgctacca tgtctgact cctgtagctt gtctatacca 3120
 tcctcacaac ataggaattg tgatagcagc acacacaccg gaaggagctg gggaaatccc 3180
 acagagggct ccgcaggatg acaggcgaat gcctacacag aagggtgggga agggaagcag 3240
 30 agggaacagc atgggcgtgg gaccacaagt ctatttgggg aagctgccgg taaccgtata 3300
 tggctggggg gaggggagag gtcattgagat gaggcaggaa gagccacagc aggcagcggg 3360
 tacgggctcc ttattgcca gaggctcgga tcttctcct cttcctcct cgggggctgc 3420
 35 ctgttcattt tccaccactg cctcccatcc aggtctgtgg cttaggacat caccagctg 3480
 cagaaactgg gcatcaccca cgtcctgaat gctgccgagg gcaggtcctt catgcacgtc 3540
 aacaccagtg ctagctteta cgaggattct ggcateacct acttgggcat caaggccaat 3600
 40 gatacgcagg agttcaacct cagtgttac tttgaaagg ccacagattt cattgaccag 3660
 gcgctggccc ataaaaatgg taaggaacgt acattccggc acccatggag cgtaagccct 3720
 ctgggacctg cttcctccaa agaggcccc acttgaaaaa ggttccagaa agatcccaa 3780
 45 atatgccacc aactagggat taagtgtcct acatgtgagc cgatgggggc cactgcatat 3840
 agtctgtgcc atagacatga caatggataa taatatttca gacagagagc aggagttagg 3900
 tagctgtgct cctttccctt taattgagtg tgcccatttt tttattcatg tatgtgtata 3960
 catgtgtgtg cacacatgcc ataggtgat actgaacacc gtcttcaatc gttccccacc 4020
 50 ccaccttatt ttttgaggca gggctctctt cctgatcctg gggctcattg gtttatctag 4080
 gctgctggcc agtgagctct ggagttctgc ttttctctac ctccctagcc ctgggactgc 4140
 aggggcatgt gctgggcccag gcttttatgt cgcgttgggg atctgaactt aggtccctag 4200
 55 gcctgagcac cgtaaagact ctgccacatc cccagcctgt ttgagcaagt gaaccattcc 4260
 ccagaattcc eccagtgggg ctttctacc cttttattgg ctaggcattc atgagtggtc 4320

60

65

ES 2 272 093 T3

acctcgccag aggaatgagt ggccacgact ggctcagggt cagcagccta gagatactgg 4380
 gttaagtctt cctgccgctc gctccctgca gccgcagaca gaaagtagga ctgaatgaga 4440
 5 gctggctagt ggtcagacag gacagaaggc tgagagggtc acagggcaga tgtcagcaga 4500
 gcagacaggt tctccctctg tgggggaggg gtggcccact gcaggtgtaa ttggccttct 4560
 ttgtgctcca tagaggcttc ctgggtacac agcagcttcc ctgtcctggg gattcccaaa 4620
 10 gagaactccc taccactgga cttacagaag ttctattgac tgggtgtaacg gttcaacagc 4680
 tttggctctt ggtggacggg gcatactgct gtatcagctc aagagctcat tcacgaatga 4740
 acacacacac acacacacac acacacacac acacaagcta attttgatat gccttaacta 4800
 15 gctcagtgac tgggcatttc tgaacatccc tgaagttagc acacatttcc ctctgggtgtt 4860
 ectggcttaa caecttctaa atctatattt taccttggct gccctgttac cttctgagaa 4920
 gccctaggg ccacttccct tcgcacctac attgctggat ggtttctctc ctgcagctct 4980
 20 taaatctgat ccctctgctt ctgagccatg ggaacagccc aataactgag ttagacataa 5040
 aaacgtctct agccaaaact tcagctaat ttagacaata aatcttactg gttgtggaat 5100
 ccttaagatt ctcatgacc tccttcacat ggcacgagta tgaagcttta ttacaattgt 5160
 25 ttattgatca aactaactca taaaaagcca gttgtctttc acctgctcaa ggaaggaaca 5220
 aaatcatcc ttaactgatc tgtgcacctt gcacaatcca tacgaatatc ttaagagtac 5280
 taagattht gttgtgagag tcacatgtta cagaatgtac agctttgaca aggtgcatcc 5340
 ttgggatgcc gaagtgcact gctgttccag cccctacct tctgaggctg ttttggaaagc 5400
 30 aatgctctgg aagcaacttt aggaggtagg atgctggaac agcgggtcac ttcagcatcc 5460
 cgatgacgaa tcccgtcaaa gctgtacatt ctgtaacaga ctgggaaagc tgcagacttt 5520
 aaggccaggg ccctatggtc cctcttaatc cctgtcacac ccaaccgag cccttctcct 5580
 35 ccagccgttc tgtgcttctc actctggata gatggagaac acggccttgc tagttaaagg 5640
 agtgaggctt cacccttctc acatggcagt ggttggctcat cctcatcag ggaactctgg 5700
 ggcatctctc ctttacttcc tctttttgga ctacagggaa tatatgctga cttgttttga 5760
 40 ccttgtgtat ggggagactg gatcttgggt ctggaatgtt tctgctagt ttttccccat 5820
 cctttggcaa accctatcta tatcttacca ctaggcatag tggccctcgt tctggagcct 5880
 gccttcaggc tggttctcgg ggacctgtc cctggtttct ccccagcata tgggtgtcac 5940
 45 agtgttcact gcgggtggtt gctgaacaaa gcggggattg catcccagag ctccgggtgcc 6000
 ttgtgggtac actgctaaga taaaatggat actggcctct ctctgaccac ttgcagagct 6060
 ctggtgcctt gtgggtacac tgctaagata aaatggatac tggcctctct ctatccactt 6120
 gcaggactct agggaaacaqq aatccattac tgggaaacc aggggttagg agcagggagg 6180
 50 tagctgggca gctgaagtgc ttggcgacta accaatgaat accagagttt ggatctctag 6240
 aatactctta aaatctgggt gggcagagtg gcctgcctgt aatcccagaa ctcgggaggc 6300
 ggagacaggg aatcatcaga gcaaaactggc taaccagaat agcaaaacac tgagctctgg 6360
 55 gctctgtgag agatcctgcc ttaacatata agagagagaa taaaacattg aagaagacag 6420
 tagatgccaa ttttaagccc ccacatgcac atggacaagt gtgcgtttga acacacatat 6480

60

65

ES 2 272 093 T3

gcactcatgt gaaccaggca tgcacactcg ggcttatcac acacataatt tgaagagag 6540
 agtgagagag gagagtgcac attagagttc acaggaaagt gtgagtgagc acacccatgc 6600
 5 acacagacat gtgtgccagg gagtaggaaa ggagcctggg tttgtgtata agagggagcc 6660
 atcatgtgtt tctaaggagg gcgtgtgaag gaggcgttgt gtgggctggg actggagcat 6720
 ggttgtaact gagcatgctc cctgtgggaa acaggagggg gccaccctg cagaggggcc 6780
 10 cactgtccag cgggatcagt aaaagcccct gctgagaact ttaggtaata gccagagaga 6840
 gaaaggtagg aaagtggggg gactcccac tctgatgtag gaggatctgg gcaagttagg 6900
 gtgctgttga ggtagaaaga ggggtgcaga ggagatgctc ttaattctgg gtcagcagtt 6960
 15 tctttccaaa taatgcctgt gaggaggtgt aggtggtggc cattcactca ctcagcagag 7020
 ggatgatgat gcccggtgga tgctggaat ggccgagcat caaccctggc tctggaagaa 7080
 ctccatcttt cagaaggaga gtggatctgt gtatggccag cggggtcaca ggtgcttggg 7140
 gcccctgggg gactcctagc actgggtgat gtttatcgag tgctcttgtg tgccaggcac 7200
 20 tggcctgggg ctttgtttct gtctctgttt tgtttcgttt tttgagacag actcttgccta 7260
 tgtatccgtg tcaatcttgg aatctcactg catagcccag gctgcggaga gaggggaggg 7320
 caataggcct tgtaagcaag ccacacttca gagactagac tccaccctgc gaatgatgac 7380
 25 aggtcagaqc tgagtcccg aagatTTTT ttccagctgc caggtggagt gtggagtggc 7440
 agctagcggc aagggtagag ggcgagctcc ctgtgcagga gaaatgcaag caagagatgg 7500
 caagccagtg agttaagcat tctgtgtggg gagcaggtgg atgaagagag aggctgggct 7560
 30 ttcgcctctg gggggggggg gaggggtggg gatgaggtga gaggagggca gctccctgca 7620
 gtgtgatgag atttttctg acagtgacct ttggcctctc cctccccac ttccttctt 7680
 tcctttcttc ccaccattgc tttccttgtc cttgagaaat tctgagtctc cacttactg 7740
 35 gtgatgcaga cggaaacaga agccgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 7800
 gtgtgtgtgt ctgtgtgtat gctgtgtgtgt gtgtttgtgt gtatgtgtgt cagtgggaat 7860
 ggctcatagt ctgcaggaag gtgggcagga aggaataagc tgtaggctga ggcagtgtgg 7920
 40 gatgcagggg gagaggagag gagggatacc agagaaggaa attaaggag ctacaagagg 7980
 gcattgttgg ggtgtgtgtg tgtgtgtgtt gtttatattt gtattggaaa tacattcttt 8040
 taaaaaacac ttatccattt atttatTTTT atgtgcacgt gtgtgtgcct gcatgagttc 8100
 atgtgtgccg cgtgtgtgcg ggaacccttg gaggccacaa gggggcatct gatccctgg 8160
 45 aactggagtt ggaggagggt gtgagtcccc tgacatgttt gctgggaact gaaccccggt 8220
 cctatgcaag agcaggaagt gcagttatct gctgagccat ctctccagtc ctgaaatcca 8280
 ttctcttaaa atacacgtgg cagagacatg atgggattta cgtatggatt taatgtggcg 8340
 50 gtcattaagt tccggcacag gcaagcacct gtaaagccat caccacaacc gcaacagtga 8400
 atgtgacct caccctcatg ttcttcatgt cccctgtccc ctccatctc cattctcaag 8460
 cacctcttgc tctgctctg tcgctggaga acagtgtgca tctgcacact cttatgtcag 8520
 55 tgaagtcaca cagcctgcac ccttctctgg tctgagtatt tgggttctga ctctgctatc 8580
 acacactact gtactgcatt ctctcgctct ctttttttaa acatattttt atttgtttgt 8640
 60
 65

ES 2 272 093 T3

gtgtatgcac atgtgccaca tgtgtacaga tactatggag gccagaagag gccatggccg 8700
 tccttggagc tggagttaca ggcagcgtgt gagctgcctg gtgtgggtgc tgggaaccaa 8760
 5 acttgaatct aaagcaagca cttttaactg ctgaggcagc tctcagtacc cttcttcatt 8820
 tctccgcctg ggttccattg tatggacaca tgtagctaga atatcttgc tttcttaatta 8880
 tgtacattgt tttgtgctaa gagagagtaa tgctctatag cctgagctgg cctcaacctt 8940
 10 gccatcctcc tgcctcagcc tcctcctcct gagtgctagg atgacaggcg agtggtaact 9000
 tacatggttt catgttttgt tcaagactga aggataacat tcatacagag aaggtctggg 9060
 tcacaaagtg tgcagttcac tgaatggcac aaccctgtat caagaaacaa aactcagggg 9120
 15 ctggagagat ggcactgact gctcttcag aggtccggag ttcaattccc agcaaccaca 9180
 tggtggtca cagccatcta taacgagatc tgaegccctc tcttgggtgt tctgaagaca 9240
 gctacagtgt actcacataa aataaataaa tctttaaacc acacacacac acacaattac 9300
 caccacagaa agcccactcc atgttcctc ccacgtctct gcctacagta ctcccaggtt 9360
 20 accactgttc aggttctaa caacctggtt tacttgggcc tcttttctgc tctgtggagc 9420
 cacacatttg tgtgcctcat acacgttctt tctagtaagt tgcataattac tctgctttt 9480
 tacatgtatt tatttattgt agttgtgtgt gcgtgtgggc ccatgcatgg cacagtgtgt 9540
 25 ggggatgtca gattattgtg aacaggggac agttcttttc ttcaatcatg tgggttccag 9600
 aggttgaact caggtcatca tgtgtggcag caaatgcctt taccactga gacatctcca 9660
 tattcttttt ttttccctg aggtgggggc ttgttccata gcccaaactg gctttgact 9720
 30 tgcagttcaa agtgactccc tgtctccacc tcttagagta ttggaattac gatgtgtact 9780
 accacacctg actggatcat taattctttg atgggggagg ggaagcgac atgctgcagg 9840
 tgaagggatg actggactgg acatgagcgt ggaagccaga gaacagcttc agtctaattgc 9900
 35 tctcccaact gagctatttc ggtttgccag agaacaactt acagaaagt tctcagtcca 9960
 tgtggattcg gggttggagt tcaactcatc agcttgacat tggctcctc acccactgag 10020
 ccttctcact actctctacc tagatcatta attctttttt aaaaagactt attagggggc 10080
 40 tggagagatg gctcagccgt taagagcacc gaatgccctt ccagaggtcc tgagttcaat 10140
 tcccagcatg ccattgctgg gcagtggggg gcgcaggtgt tcaacgtgag tagctgttgc 10200
 cagttttccg cgggtggagaa cctcttgaca ccctgctgtc cctggtcatt ctgggtgggt 10260
 gcatggtgat atgcttgttg tatggaagac tttgactgtt acagtgaagt tgggcttcca 10320
 45 cagttaccac gtctccctg tttcttgcag gccgggtgct tgtccattgc cgcgagggct 10380
 acagccgctc cccaacgcta gttatcgctt acctcatgat gcggcagaag atggacgtca 10440
 agtctgctct gactactgtg aggcagaatc qtqagatcgg ccccaargar ggrtctctgg 10500
 50 cccaactctg ccagctcaat gacagactag ccaaggaggg caaggtgaaa ctctaggggtg 10560
 cccacagcct cttttgcaga ggtctgactg ggaggccctt ggcagccatg tttaggaaac 10620
 acagtatacc cactccctgc accaccagac acgtgcccac atctgtccca ctctggctct 10680
 55 cgggggcccac tccaccctta gggagcacat gaagaagctc cctaagaagt tctgctcctt 10740
 agccatcctt tctgttaatt tatgtctctc cctgaggtga ggttcaggtt tatgtccctg 10800

60

65

ES 2 272 093 T3

tctgtggcat agatacatct cagtgaccca ggggtgggagg gctatcaggg tgcattggccc 10860
 gggacacggg cactcttcat gacccctccc ccacctgggt tcttcctgtg tggccagaa 10920
 ccacgagcct ggtaaaggaa ctatgcaaac acaggccctg acctcccat gtctgttctt 10980
 5 ggtcctcaca gcccgacacg ccctgctgag gcagacgaat gacattaagt tctgaagcag 11040
 agtgagagata gattagtac tagatttcca aaaagaagg aaaaaaggc tgcattttaa 11100
 aattatttcc ttagaattaa agatactaca taggggccct tgggtaagca aatccatttt 11160
 10 tcccagaggc tatcttgatt ctttggatg tttaaagtgt gccttgccag agagcttacg 11220
 atctatatct gctgcttcag agccttcctt gaggatggct ctgttccttt gcttgtaga 11280
 agagcgatgc cttgggcagg gtttccccct tttcagaata cagggtgtaa agtccagcct 11340
 15 attacaaaca aacaaacaaa caaacaaaca aaggacctcc atttggagaa ttgcaaggat 11400
 tttatcctga attatagtgt tgggtgagttc aagtcacac gccaaagtgt tgccatcctg 11460
 gttgctatc taagaataat taggaggagg aacctagcca attgcagctc atgtcctgtg 11520
 20 gtgtgtgcac ggggtgcatat gttggaagg gtgcctgtcc ccttggggac agaaggaaaa 11580
 tgaaggccc ctctgctcac cctggccatt tacgggaggc tctgctggtt ccacggtgtc 11640
 tgtgcaggat cctgaaactg actcgctgga cagaaacgag acttggcggc accatgagaa 11700
 25 tggagagaga gagagcaaag aaagaaacag cctttaaag aactttctaa ggggtggttt 11760
 tgaacctcgc tggacctgt atgtgtgcac atttgccaga gattgaacat aatcctcttg 11820
 ggacttcacg ttctcattat ttgtatgtct ccggggtcac gcagagccgt cagccaccac 11880
 30 cccagacccc ggcacatagg cgtctcataa aagccattt tatgagaacc agagctggtt 11940
 gagtaccctg tgtatagaga gaggttgtgt cgtggggcac ccggatcca gcagcctggt 12000
 tgcctgctg taggatgtct tacaggagtt tgcagagaaa ccttccttgg agggaaagaa 12060
 atatcagggg tttttgttga atatttcaa ttcagcttta agtgtaagac tcagcaggtg 12120
 35 tcatggtaa ggtaaggac atgccttttc cagagctgct gcaagaggca ggagaagcag 12180
 acctgtctta ggatgtcact cccagggtaa agacctctga tcacagcagg agcagagctg 12240
 tgcagcctgg atggctattg tcccctatc tgtgtgacca cagcaaccct ggtcacatag 12300
 40 ggctggcat cctttttttt tttttttttt tttttttttg gcccagaatg aagtgacct 12360
 agccaagttg tgtacctcag tctttagttt ccaagcggct ctcttgctca atacaatgtg 12420
 catttcaaaa taacctgta gaggttgacag aactggttca tgtgttatga gagaggaaaa 12480
 45 gagaggaaag aacaaaacaa aacaaaacac cacaaaccaa aaacatctgg gctagccagg 12540
 catgattgca atgtctacag gccagttca tgagaggcag agacaggaag accgccgaaa 12600
 ggtcaaggat agcatggtct acgtatcgag actccagcca gggctacggc cccaagatcc 12660
 50 taggttttgg attttgggct ttggttttt agacaggggt tctctgtgta gccctggctg 12720
 tcctggaact cgctctgtag accaggctgg cctcaaactt agagatctgc ctgactctgc 12780
 ctttgagggc tgggacgaat gccaccactg cccaactaag attccattaa aaaaaaaaaa 12840
 55 agttcaagat aattaagagt tgccagctcg ttaaagctaa gtagaagcag tctcaggcct 12900
 gctgcttgag gctgttcttg gcttggacct gaaatctgcc cccaacagtg tccaagtgca 12960

60

65

ES 2 272 093 T3

catgactttg agccatctcc agagaaggaa gtgaaaattg tggctcccca gtcgattggg 13020
 acacagtctc tctttgtcta ggtaacacat ggtgacacat agcattgaac tctccactct 13080
 5 gaggggtggg ttcctccccc ctgcctcttc tgggttggtc accccatagg acagccacag 13140
 gacagtcact agcacctact ggaaccctct ttgtgggaac atgaagaaag agcctttggg 13200
 agattcctgg ctttccatta gggctgaaag tacaacgggt cttgggtggc tttgcctcgt 13260
 10 gtttataaaa ctagctacta ttcttcagggt aaaataccga tgttgggaa aagccaaccc 13320
 cgtggctgcc cgtgagttag ggggtggggt gggaatcctg gatagtgttc tatccatgga 13380
 aagtggtgga ataggaatta aggggtgtcc ccccccccc aacctcttcc tcagaccag 13440
 ccactttcta tgacttataa acatccagggt aaaaattaca aacataaaaa tggtttctct 13500
 15 tctcaatctt ctaaagtctg cctgcctttt ccaggggtag gtctgtttct ttgctgttct 13560
 attgtcttga gagcacagac taacacttac caaatgaggg aactcttggc ccatactaag 13620
 gctcttctgg gctccagcac tcttaagtta ttttaagaat tctcacttgg ccttttagcac 13680
 20 acccgccacc cccaagtggg tgtggataat gccatggcca gcagggggca ctgttgaggc 13740
 ggggtgcctt ccaccttaag ttgcttatag tattaagat gctaaatgtt ttaatcaaga 13800
 gaagcactga tcttataata cgaggataag agattttctc acaggaaatt gtctttttca 13860
 25 taattctttt acaggctttg tcctgatcgt agcatagaga gaatagctgg atatttaact 13920
 tgtattccat tttcctctgc cagcgttagg ttaactccgt aaaaagtgat tcagtggacc 13980
 gaagaggctc agagggcagg ggatggtagg gtgaggcaga gcactgtcac ctgccaggca 14040
 30 tgggaggtcc tgccatccgg gaggaaaagg aaagtttagc ctctagtcta ccaccagtgt 14100
 taacgcactc taaagtgtta accaaaataa atgtcttaca ttacaaagac gtctgttttg 14160
 tgtttccttt tgtgtgtttg ggctttttat gtgtgcttta taactgctgt ggtgggtgctg 14220
 35 ttgttagttt tgaggtagga tctcaggctg gccttgaact tctgatcgcc tgcccctgcc 14280
 cctgcccctg cccctgtccc tgcctccaag tgctaggact aaaagcacat gccaccacac 14340
 cagtacagca tttttctaac atttaaaaat aatcacctag gggctggaga gagggttcca 14400
 gctaagagtg cacactgctc ttgggtagga cctgagttta gttcccagaa cctatactgg 14460
 40 gtggctccag gtccagagga tccaggacct ctggcctcca tgggcatctg ctcttagcac 14520
 ataccacat acagatacac acataaaaat aaaatgaagc ctttaaaaac ctccataaac 14580
 ctagcccttg gaggtacgac tctggaaagc tggcactctg tgaagtcca tctcatggtg 14640
 45 ttctggctaa cgtaagactt acagagacag aaaagaactc aggggtgtgct ggggggttggg 14700
 atggaggaag agggatgagt agggggagca cggggaactt gggcagtga aattctttgc 14760
 aggacactaq aqqaggataa ataccagtca ttgcacccac tcttgggaca ctccayyyaa 14820
 50 ttatgctggg tgaagagaga agggccccagg tattggctgc attggctgca tttgcgtaac 14880
 atttttttaa attgaaaaga aaaagatgta aatcaagggt agatgagtgg ttgctgtgag 14940
 ctgagagctg ggggtgagtga gacatgtgga caactccatc aaaaagcgac agaaagaacg 15000
 55 ggctgtgggt acagctacct ctaatctcca cctccgggag gtgatcaagg ttagccctca 15060
 gctagcctgt ggtgcatgag accctgtttc aaaaacttta ataaagaaat aatgaaaaaa 15120

60

65

ES 2 272 093 T3

	gacatcaggg cagatccttg gggccaaagg cggacaggcg agtctcgtgg taaggctcgtg	15180
	tagaagcgga tgcattgagca cgtgcccagc gcatcatgag agagccctag gtaagtaagg	15240
5	atggatgtga gtgtgtcggc gtcggcgcac tgcacgtcct ggctgtggtg ctggactggc	15300
	atctttggtg agctgtggag gggaaatggg tagggagatc ataaaatccc tccgaattat	15360
	ttcaagaact gtctattaca attatctcaa aatattaaaa aaaaagaaga attaaaaaac	15420
10	aaaaaaccta tccaggtgtg gtggtgtgca cctatagcca cgggcacttg gaaagctgga	15480
	gcaagaggat ggcgagtttg aaggtatctg gggctgtaca gcaagaccgt cgtcccaaaa	15540
	ccaaaccaaa cagcaaacc c attatgtcac acaagagtgt ttatagttag cggcctcgct	15600
15	gagagcatgg ggtgggggtg ggggtggggg acagaaatat ctaaactgca gtcaataggg	15660
	atccactgag accctggggc ttgactgcag cttaaccttg ggaaatgata agggttttgt	15720
	gttgagttaa agcatcgatt actgacttaa cctcaaatga agaaaaagaa aaaaagaaaa	15780
20	caacaaaagc caaaccaagg ggctggtgag atggctcagt gggtaagagc acccgactgc	15840
	tcttccgaag gtccagagtt caaatcccag caaccacatg gtggctcaca accatctgta	15900
	acgagatatg atgccctctt ctggtgtgtc tgaagacagc tacagtgtac ttacatataa	15960
25	taaataaatc ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagccaaa ccgagcaaac caggccccc	16020
	aacagaaggc aggcacgacg gcaggcacca cgagccatcc tgtgaaaagg cagggtacc	16080
	catgggccga ggagggtcca gagagatagg ctggttaagct cagtttctct gtataccctt	16140
	tttcttgttg aactacttc aattacagat aaaataacaa ataaacaaaa tctagagcct	16200
30	ggccactctc tgctcgcttg atttttcttg ttacgtccag caggtggcgg aagtgttcca	16260
	aggacagatc gcatcattaa ggtggccagc ataactctccc atcagcaggt ggtgctgtga	16320
	gaaccattat ggtgctcaca gaatcccggg cccaggagct gccctctccc aagtctggag	16380
35	caataggaaa gctttctggc ccagacaggg ttaacagtcc acattccaga gcaggggaaa	16440
	aggagactgg aggtcacaga caaaagggcc agcttctaac aacttcacag ctctggtagg	16500
	agagatagat ccccccaac aatggccaca gctggttttg tctgccccga aggaaactga	16560
40	cttaggaagc aggtatcaga gtccccttcc tgaggggact tctgtctgcc ttgtaaagct	16620
	gtcagagcag ctgcattgat gtgtgggtga cagaagatga aaaggaggac ccaggcagat	16680
	cgccacagat ggaccggcca cttaacaagtc gaggcaggtg gcagagcctt gcagaagctc	16740
45	tgcaggtgga cgacactgat tcattacca gttagcatak cacagcgggc taggcggacc	16800
	acagcctcct tcccagttt cctccagggc tggggagtcc tccaaccttc tgtctcagtg	16860
	cagcttccgc cagcccctcc tccctttgca cctcaggtgt gaacctccc tctctcctt	16920
	ctccctgtgg catggccctc ctgctactgc aggtgagca ttggatttct ttgtgcttag	16980
50	atagacctga gatggcttct tgatttatat atatatatcc atcccttga tcttacatct	17040
	aggaccaga gctgcttctg ataccataag aggtgggga gatgatagg taagagtgtc	17100
	tgctgtacaa gcatgaagac atgagttcga atccccagca accatgtgga aaaataacct	17160
55	tctaacctca gagttgaggg gaaaggcagg tggattctgg gggcttactg gccagctagc	17220
	cagcctaacc taaatgtctc agtcagagat cctgtctcag ggaataactt gggagaatga	17280
60		
65		

ES 2 272 093 T3

ctgagaaaga cacctcctca ggtctcccat gcacccacac agacacacgg ggggggggta 17340
 atgtaataag ctaagaaata atgagggaaa tgattttttg ctaagaaatg aaattctgtg 17400
 5 ttggccgcaa gaagcctggc cagggagga actgccttg gcacaccagc ctataagtca 17460
 ccatgagttc cctggctaag aatcacatgt aatggagccc aggtccctct tgccctgggg 17520
 ttgcctctcc cactggtttt gaagagaaat tcaagagaga tctccttggc cagaattgta 17580
 10 ggtgctgagc aatgtggagc tggggtcaat gggattcctt taaaggcatc cttcccaggg 17640
 ctgggtcata cttcaatagt aggggtgcttg cacagcaagc gtgagaccct aggttagagt 17700
 ccccagaatc tgcccccaac cccccaaaaa ggcacccctc tgccctctggg tgggtggggg 17760
 gagcaaacac ctttaactaa gaccattagc tggcaggggt aacaaatgac cttggctaga 17820
 15 ggaatttggc caagctggat tccgccttct gtagaagccc cacttgtttc ctttgtaag 17880
 ctggcccaca gtttgttttg agaatgcctg agggggccag ggagccagac aattaaagc 17940
 caagctcatt ttgatatctg aaaaccacag cctgactgce ctgcccgtgg gaggtactgg 18000
 20 gagagctggc tgtgtccctg cctcaccaac gcccccccc ccaacacaca ctccctcgggt 18060
 cacctgggag gtgccagcag caatttggaa gtttactgag cttgagaagt cttgggaggg 18120
 ctgacgctaa gcacaccctc tctccacccc cccccacccc acccccgtga ggaggaggg 18180
 25 gaggaaacat gggaccagcc ctgctccagc ccgtccttat tggctggcat gaggcagagg 18240
 gggctttaa aaggcaaccg tatctaggct ggacactgga gcctgtgcta ccgagtgccc 18300
 tcctccacct ggcagcatgc agccctcact agccccgtgc ctcatctgcc tacttgtgca 18360
 30 cgctgccttc tgtgctgtgg agggccaggg gtggcaagcc ttcaggaatg atgccacaga 18420
 ggtcatccca gggcttggag agtaccocga gcctcctcct gagaacaacc agaccatgaa 18480
 ccgggcgggag aatggaggca gacctccca ccatccctat gacgccaaag gtacgggatg 18540
 35 aagaagcaca ttagtggggg ggggggtcct gggagggtgac tggggtggtt ttagcatctt 18600
 cttcagaggt ttgtgtgggt ggctagcctc tgctacatca gggcagggac acatttgctt 18660
 ggaagaatac tagcacagca ttagaacctg gagggcagca ttggggggct ggtagagagc 18720
 acccaaggca ggggtggaggc tgaggtcagc cgaagctggc attaacacgg gcatgggctt 18780
 40 gtatgatggc ccagagaatc tcctcctaag gatgaggaca caggtcagat ctagctgctg 18840
 accagtgggg aagtgatatg gtgaggctgg atgccagatg ccatccatgg ctgtactata 18900
 tcccacatga ccaccacatg aggtaaagaa ggccccagct tgaagatgga gaaaccgaga 18960
 45 ggctcctgag ataaagtcac ctgggagtaa gaagagctga gactggaagc tggtttgatc 19020
 cagatgcaag gcaaccctag attgggtttg ggtgggaacc tgaagccagg aggaatccct 19080
 ttagttcccc cttggccagg gtctgtctca tgagcccaga gyytlaycat taaaagaaca 19140
 50 gggttttagt gtggcatgtg acatgagggg cagctgagtg aaatgtcccc tgtatgagca 19200
 cagggtggac cacttgccct gagcttgca cctgacccca gctttgcctc attcctgagg 19260
 acagcagaaa ctgtggaggc agagccagca cagagagatg cctgggggtg ggggtgggggt 19320
 55 atcacgcacg gaactagcag caatgaatgg ggtgggggtg cagctggagg gacactccag 19380
 agaaatgacc ttgctggcca ccatttgggt gggaggagag ctcattttcc agcttgccac 19440

60

65

ES 2 272 093 T3

	cacatgctgt ccctcctgtc tcctagccag taagggatgt ggaggaaagg gccaccccaa	19500
	aggagcatgc aatgcagtca cgtttttgca gaggaagtgc ttgacctaaq ggcactattc	19560
5	ttggaaagcc ccaaaactag tccttcctcg ggcaaacagg cctccccac ataccacctc	19620
	tgcaggggtg agtaaattaa gccagccaca gaaggggtggc aaggcctaca cctccccct	19680
	gttgtgcccc ccccccccc gtgaaggtgc atcctggcct ctgcccctct ggctttggta	19740
10	ctgggatttt ttttttcctt ttatgtcata ttgatcctga caccatggaa cttttggagg	19800
	tagacaggac ccacacatgg attagttaaa agcctcccat ccatctaagc tcatggtagg	19860
	agatagagca tgtccaagag aggagggcag gcatcagacc tagaagatat ggctgggcat	19920
15	ccaacccaat ctccttcccc ggagaacaga ctctaagtca gatccagcca cccttgagta	19980
	accagctcaa ggtacacaga acaagagagt ctggatataca gcaggtgcta aacaaatgct	20040
	tgtggtagca aaagctatag gttttgggtc agaactccga cccaagtcgc gagtgaagag	20100
20	cgaaaggccc tctactcgcc accgccccgc ccccacctgg ggtcctataa cagatcactt	20160
	tcacccttgc gggagccaga gagccctggc atcctaggta gccccccccg ccccccccc	20220
	gcaagcagcc cagccctgcc tttggggcaa gttcttttct cagcctggac ctgtgataat	20280
	gaggggggtg gacgcgccgc ctttggtcgc tttcaagtct aatgaattct tatccctacc	20340
25	acctgccctt ctacccccgct cctccacagc agctgtcctg atttattacc ttcaattaac	20400
	ctccactcct ttctccatct cctgggatac cgccccctgtc ccagtggctg gtaaaggagc	20460
	ttaggaagga ccagagccag gtgtggctag aggctaccag gcagggctgg ggatgaggag	20520
30	ctaaactgga agagtgtttg gtttagtaggc acaaagcctt ggggtgggatc cctagtaccg	20580
	gagaagtgga gatgggcgct gagaagttca agaccatcca tccttaacta cacagccagt	20640
	ttgaggccag cctgggctac ataaaaaccc aatctcaaaa gctgccaatt ctgattctgt	20700
35	gccacgtagt gcccgatgta atagtggatg aagtcgttga atcctggggc aacctatfff	20760
	acagatgtgg ggaaaagcaa ctttaagtac cctgcccaca gatcacaag aaagtaagtg	20820
	acagagctcc agtgtttcat cctggggttc caaggacagg gagagagaag ccagggtggg	20880
40	atctcactgc tccccggtgc ctcttccta taatccatac agattcgaaa gcgcagggca	20940
	ggtttgaaa aagagagaag ggtggaagga gcagaccagt ctggcctagg ctgcagcccc	21000
	tcacgcatcc ctctctccgc agatgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc	21060
	cgcttcctga cagacggccc atgcccagc gccaaagccgg tcaccgagtt ggtgtgctcc	21120
45	ggccagtgcg gccccgcgcg gctgctgccc aacgccatcg ggcgctgaa gtggtggcgc	21180
	ccgaacggac cggatttccg ctgcatcccg gatcgctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg	21240
	ctgtgccccg ggggcgcggc gccgcgctcg cgcaaggtgc gtctggtggc ctctgcaag	21300
50	tgcaagcgcc tcacccgctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg gccggagacc	21360
	gcgcggccgc agaagggtcg caagccgcgg cccggcgcgc ggggagccaa agccaaccag	21420
	gcggagctgg agaacgccta ctagagcgag cccgcgccta tgcagcccc gcgcgatccg	21480
55	attcgtttcc agtgtaaagc ctgcagccca ggccaggggt gccaaacttt ccagaccgtg	21540
	tggagtcccc agcccagtag agaccgcagg tccttctgcc cgctgcgggg gatggggagg	21600
60		
65		

ES 2 272 093 T3

5 ggggtgggggtt cccgcggggcc aggagaggaa gcttgagtcc cagactctgc ctagccccgg 21660
 gtgggatggg ggtctttcta ccctcgccgg acctatacag gacaaggcag tgtttccacc 21720
 10 ttaaagggaa gggagtgtgg aacgaaagac ctgggactgg ttatggacgt acagtaagat 21780
 ctactccttc cacccaaatg taaagcctgc gtgggctaga tagggtttct gaccctgacc 21840
 tggccactga gtgtgatgtt gggctacgtg gttctctttt ggtacggctt tctttgtaaa 21900
 atagggaccg gaactctgct gagattccaa ggattggggg accccgtgta gactgggtgag 21960
 agagaggaga acaggggagg ggttagggga gagattgtgg tgggcaaccg cctagaagaa 22020
 gctgtttgtt ggctcccagc ctcgccgctt cagaggtttg gcttccccca ctccctcctc 22080
 15 tcaaactctgc cttcaaatcc atatctggga tagggaaggc cagggctccga gagatgggtg 22140
 aagggccaga aatcacactc ctggccccc gaagagcagt gtcccgcctc caactgcctt 22200
 gtcataattgt aaagggattt tctacacaac agttaaaggc cgttgaggga aactgggctt 22260
 gccagtcacc tcccctcctt gtcccttgcc aggacaccac ctccctgcctg ccacccacgg 22320
 20 acacatttct gtctagaaac agagcgtcgt cgtcgtgtcc tctgagacag catatcttac 22380
 attaaaaaga ataatacggg gggggggggc ggagggcga agtgttatac atatgctgag 22440
 aagctgtcag gcgccacagc accaccaca atctttttgt aatcatttc cagacacctc 22500
 25 ttactttctg tgtagatttt aattgttaaa aggggaggag agagagcgtt tghtaacagaa 22560
 gcacatggag gggggggtag ggggggtggg gctggtagt ttggcgaact tccatgtga 22620
 gactcatcca caaagactga aagccgcgtt tttttttta agagttcagt gacatattta 22680
 30 ttttctcatt taagttatt atgccaacat tttttcttg tagagaaagg cagtgttaat 22740
 atcgctttgt gaagcacaag tgtgtgtggg tttttgtttt ttgttttttc cccgaccaga 22800
 ggcattgtta ataaagacaa tgaatctcga gcaggaggct gtggtcttgt tttgtcaacc 22860
 35 acacacaatg tctcgccact gtcactcac tcccctccct tggtcacaag acccaaacct 22920
 tgacaacacc tccgactgct ctctggtagc ccttgtggca atacgtgttt cctttgaaaa 22980
 gtcacattca tcccttccct tgcaaacctg gctctcattc cccagctggg tcatcgctcat 23040
 40 accctcacc cagcctccct ttagctgacc actctccaca ctgtctcca aaagtgcacg 23100
 tttcaccgag ccagttccct ggtccaggtc atcccattgc tcctccttgc tccagacctt 23160
 tctcccacaa agatgttcat ctcccactcc atcaagcccc agtggccctg cggctatccc 23220
 tgtctcttca gttagctgaa tctacttgcg gacaccacat gaattccttc ccctgtctta 23280
 45 aggttcatgg aactcttgc tgcccctgaa ccttccagga ctgtcccagc gtctgatgtg 23340
 tcctctctct tgtaaagccc caccctacta tttgattccc aattctagat ctcccttgt 23400
 tcattccttc acgggaragr gttctatctg gccaaagtcc gcttgatall yyataaatg 23460
 50 caaagccaag tacaattgag gaccagttca tcattgggcc aagctttttc aaaatgtgaa 23520
 ttttacacct atagaagtgt aaaagccttc caaagcagag gcaatgcctg gctcttccct 23580
 caacatcagg gctcctgctt tatgggtctg gtgggtagt acattcataa acccaacact 23640
 55 aggggtgtga aagcaagatg attgggagt cagggccaat cttggctatg aggcctgtc 23700
 tcaacctcct ctccctccct ccagggtttt gttttgtttt gtttttttga tttgaaactg 23760

60

65

ES 2 272 093 T3

	caacacttta aatccagtca agtgcacatt tgcgtgaggg gaactctatc cctaataataa	23820
	gcttccatct tgatttgtgt atgtgcacac tgggggttga acctgggcct ttgtacctgc	23880
5	cgggcaagct ctctactgct ctaaaccag ccctcactgg ctttctgttt caactcccaa	23940
	tgaattcccc taaatgaatt atcaatatca tgtctttgaa aaataccatt gagtgctgct	24000
	gggtgccctg tggttccaga ttccaggaag gacttttcag ggaatccagg catcctgaag	24060
10	aatgtcttag agcaggaggc catggagacc ttggccagcc ccacaaggca gtgtggtgca	24120
	gaggggtgagg atggaggcag gcttgcaatt gaagctgaga cagggctactc aggattaaaa	24180
	agcttcccc aaaacaattc caagatcagt tcctggtact tgcacctgtt cagctatgca	24240
15	gagcccagtg ggcataaggc aagacaccgg ttgtactgtc atgtactaac tgtgcttcag	24300
	agccggcaga gacaaataat gttatggtga ccccagggga cagtattcc agaaggaaca	24360
	cagaagagag tgctgctaga ggctgcctga aggagaaggg gtcccagact ctctaagcaa	24420
	agactccact cacataaaga cacaggctga gcagagctgg ccgtggatgc agggagccca	24480
20	tccaccatcc ttttagcatgc ccttgtattc ccatcacatg ccagggatga ggggcatcag	24540
	agagtccaag tgatgcccaa acccaaacac acctaggact tgctttctgg gacagacaga	24600
	tgcaggagag actaggttgg gctgtgatcc cattaccaca aagagggaaa aaacaaaaaa	24660
25	caacaaaca aacaaaaaaaa aacaaaacaa aacaaaaaaaa aaccaaggt ccaattgta	24720
	ggtcaggtta gagtttattt atggaaagt atattctacc tccatggggt ctacaaggct	24780
	ggcgcccatc agaaagaaca aacaacaggc tgatctggga ggggtggtac tctatggcag	24840
30	ggagcacgtg tgcttggggg acagccagac acggggcttg tattaatcac agggcttgta	24900
	ttaataggct gagagtcaag cagacagaga gacagaagga aacacacaca cacacacaca	24960
	cacacacaca cacacacaca catgcacaca ccactcactt ctactcgaa gagcccctac	25020
	ttacattcta agaacaacc attcctcctc ataaaggaga caaagttgca gaaacccaaa	25080
35	agagccacag ggccccact ctctttgaaa tgacttggac ttgttgacagg gaagacagag	25140
	gggtctgcag aggtctcctg ggtgaccag agccacagac actgaaatct ggtgctgaga	25200
	cctgtataaa ccctcttcca caggttccct gaaaggagcc cacattcccc aacctgtct	25260
40	cctgaccact gaggatgaga gcacttgggc cttccccatt cttggagtgc accctggttt	25320
	ccccatctga gggcacatga ggtctcaggt cttgggaaag ttccacaagt attgaaagtg	25380
	ttcttgtttt gtttgtgatt taatttaggt gtatgagtgc ttttgcttga atatatgcct	25440
45	gtgtagcatt tacāagcctg gtgcctgagg agatcagaag atggcatcag ataccctgga	25500
	actggacttg cagacagtta tgagccactg tgtgggtgct aggaacagaa cctggatcct	25560
	ccggaagagc agacagccag cgctcttagc cactaagcca tctactgaggt tctttctgtg	25620
50	gctaaagaga caggagacaa aggagagttt cttttagtca ataggaccat gaatgttctt	25680
	cgtaacgtga gactagggca ggggtgatccc ccagtgcac cgatggccct gtgtagtat	25740
	tagcagctct agtcttattc cttaataagt ccagtttgg ggcaggagat atgtattccc	25800
55	tgctttgaag tggctgaggt ccagttatct acttccaagt acttgtttct ctttctggag	25860
	ttggggaagc tccctgcctg cctgtaaatg tgtccattct tcaaccttag acaagatcac	25920

60

65

ES 2 272 093 T3

tttccctgag cagtcaggcc agtccaaagc ccttcaattt agctttcata aggaacaccc 25980
 cttttgttgg gtggaggtag cacttgcctt gaatcccagc attaagaagg cagagacagt 26040
 5 cggatctctg tgagttcaca gccagectgg tctacggagt gagttccaag acagccaggc 26100
 ctacacagag aaaccctgtc tcgaaaaaaaa caaaaacaaa agaaataaag aaaaagaaaa 26160
 caaaaacgaa caaacagaaa aacaagccag agtgtttgtc cccgtatttt attaatacata 26220
 10 tttttgtccc tttgccattt tagactaaaa gactcgggaa agcaggctct tctctgtttc 26280
 tcatccggac acaccagaa ccagatgtat ggaagatggc taatgtgctg cagttgcaca 26340
 tctggggctg ggtggattgg ttagatggca tgggctgggt gtggttacga tgactgcagg 26400
 15 agcaaggagt atgtggtgca tagcaaacga ggaagtttgc acagaacaac actgtgtgta 26460
 ctgatgtgea ggtatgggca catgcaagca gaagccaagg gacagcctta gggtagtgtt 26520
 tccacagacc cctccccctt ttaacatgg gcatctctca ttggcctgga gcttgccaac 26580
 tgggctgggc tggctagctt gtaggtccca gggatctgca tatctctgcc tccctagtgc 26640
 20 tgggattaca gtcatatatg agcacacctg gcttttttat gtgggtctct ggccttgaac 26700
 ccagatctga gtgcttgcaa ggcaatcggg tgaatgactg cttcatctcc ccagaccctg 26760
 ggattctact ttctattaaa gtatttctat taaatcaatg agccccctgc cctgcactca 26820
 25 gcagttctta ggcctgctga gagtcaagtg gggagtgaga gcaagcctcg agaccccatc 26880
 agcgaagcag aggacaaaga aatgaaaact tgggattcga ggctcgggat atggagatac 26940
 agaaagggtc agggaaggaa atgaaccaga tgaatagagg caggaagggt agggccctgc 27000
 30 atacatggaa cctgggtgtac atgttatctg catggggttt gcattgcaat ggctcttcag 27060
 caggttcacc aactcgggaa acagaagcca aaaagaagag taggtggtgt tggagtcaga 27120
 tactgtcagt catgcctgaa gaaatggaag caattaacga tgcgccgcaa ttaggatatt 27180
 35 agctccctga agaaaggcaa gaagctgggc tgtgggcact gaagggagct ttgaatgatg 27240
 tcacattctc tgtatgccta gcagggcagt attggagact gagacttgac ttgtgtgtcc 27300
 atatgattcc tccctttcct acagtcactt ggggctcctg agcttcgtcc ttgtccaaga 27360
 40 acctggagct ggcagtgggc agctgcagtg atagatgtct gcaagaaaga tctgaaaaga 27420
 gggaggaaga tgaaggacc acagggaccac cgacctctgc tgcctgacaa agctgcagga 27480
 ccagtctctc ctacagatgg gagacagagg cgagagatga atggtcaggg gaggagtcat 27540
 agaaaggaga gggtgaggca gagaccaaag gagggaaaca cttgtgctct acagctactg 27600
 45 actgagtacc agctgctggt cagacagcca atgccaaggc tgggctgate atggcacctc 27660
 gtgggactcc tagcccagtg ctggegagagg ggagtgtgta atggtgcatg gtttggatat 27720
 gatctgaatq tqqtccaqcc ctagtctcct tccagtrggt gggataaagc accctgacca 27780
 50 aagctacttt tttgtttgtt tgttttgggt tggttttgtt tggttttctg aggcaggggt 27840
 tctctgtatc accctagctg tcctggaact cactctgtag accaggctgg cctcgaactc 27900
 agaaatcccc ctgcctctgc ctctaagtg ctggaattaa aggcctgcgc caccactgcc 27960
 55 ggcccaaagc tactttaaga gagagagagg aatgtataag tattataatt ccaggttata 28020
 gttcattgct gtagaattgg agtcttcata ttccaggtaa tctcccacag acatgccaca 28080

60

65

ES 2 272 093 T3

aaacaacctg ttctacgaaa tctctcatgg actcccttcc ccagtaattc taaactgtgt 28140
 caaatctaca agaaatagtg acagtcacag tctctaacgt ttggggcatg agtctgaagt 28200
 5 ctcattgcta agtactggga agatgaaaaac tttacctagt gtcagcattt ggagcagagc 28260
 ctttgggatt tgagatggtc ttttgcagag ctccctaatgg ctacatggag agagggggcc 28320
 tgggagagac ccatacacct tttgctgcct tatgtcacct gacctgctcc ttgggaagct 28380
 10 ctagcaagaa ggccttccct ggatcaccca ccaccttgca cctccagaac tcagagccaa 28440
 attaaacttt cttgttactg tcgtcaaagc acagtcggtc tgggttgtat cactgtcaat 28500
 gggaaacaga cttgcctgga tggataactt gtacattgca taatgtctag aaatgaaaag 28560
 15 tcctatagag aaaaagaaaa ttagctggca cacagataga ggcctggag gaggctggct 28620
 ttgtcctccc cgaggagggtg gcgagtaagg tgtaaagtgt catggatgta aatgggcccc 28680
 tatatgaggg tctggggtaa caagaaggcc tgtgaatata aagcactgaa ggtatgtcta 28740
 gtctggagaa ggtcactaca gagagtctc caactcagtg cccatacaca cacacacaca 28800
 20 cacacacaca cacacacaca cacacacaca ccacaaagaa aaaaaggaag aaaaatctga 28860
 gagcaagtac agtacttaaa attgtgtgat tgtgtgtgtg actctgatgt cacatgctca 28920
 tcttgcccta tgagttgaaa accaaatggc ccctgagagg cataacaacc aactgttgg 28980
 25 ctgtgtgctc acgttttct taaagcgtct gtctggtttg ctgctagcat caggcagact 29040
 tgcagcagac tacatatgct cagccctgaa gtccttctag ggtgcatgtc tcttcagaat 29100
 ttcagaaagt catctgtggc tccaggaccg cctgcactct cctctgccg cgaggctgca 29160
 30 gactctaggc tggggtggaa gcaacgctta cctctgggac aagtataaca tgttggcttt 29220
 tctttccctc tgtggctcca acctggacat aaaatagatg caagctgtgt aataaatatt 29280
 tcctcccgtc cacttagttc tcaacaataa ctactctgag agcacttatt aataggtggc 29340
 35 ttagacataa gctttggctc attccccac tagctcttac ttctttaact ctttcaaacc 29400
 attctgtgtc ttccacatgg ttagttacct ctccctccat cctggttcgc ttcttcctc 29460
 gagtcgccct cagtgtctct aggtgatgct tgtaagatat tctttctaca aagctgagag 29520
 40 tgggtggcact ctgggagttc aaagccagcc tgatctacac agcaagctcc aggatatcca 29580
 gggcaatgct gggaaaacct ttctcaaca aaaagagggg ttcagttgtc aggaggagac 29640
 ccatgggtta agaagtctag acgagccatg gtgatgcata cctttcatcc aagcacttag 29700
 gaggcaaaga aaggtgaaac tctttgactt tgaggccagc taggttacat agtgatacco 29760
 45 tgcttagtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgttaatt taaaagtcta 29820
 aaaatgcatt cttttaaaaa tatgtataag tatttgctg cacatatgta tgtatgtatg 29880
 tataccatgt gtgtgtctgg tgctgaagga ctaggcatag actccctaga actagagtca 29940
 50 tagacagttg tgacactccc caacccccca ccatgtgggt gcttgaagct aaactcctgt 30000
 cctttgtaaa gcagcaggtg tctatgaacc ctgaaccatc tctccagtct ccagatgtgc 30060
 attctcaaag aggagtccct catatttccc taaactgaac atccttatca gtgagcatcc 30120
 55 tcgagtcacc aaagctactg caaacctctc tagggaacat tcactattca cttctacttg 30180
 gctcatgaaa cttaagtaca cacacacaaa cacacacaca cacacagagt catgcactca 30240

60

65

ES 2 272 093 T3

caaaagcatg catgtacacc attcttatta gactatgctt tgctaaaaga ctttcctaga 30300
 tactttaaaa catcacttct gccttttggg gggcagggtc caagattggg actggcgtag 30360
 5 tggaaactga acaaggtaga gatctagaaa tcacagcagg tcagaagggc cagcctgtac 30420
 aagagagagt tccacacctt ccaggaacac tgagcagggg gctgggacct tgcctctcag 30480
 cccaagaaac tagtgcgttt cctgtatgca tgcctctcag agattccata agatctgcct 30540
 10 tctgccataa gatctcctgc atccagacaa gcctagggga agttgagagg ctgcctgagt 30600
 ctctcccaca ggcccccttct tgccctggcag tattttttta tctggaggag aggaatcagg 30660
 gtgggaatga tcaaatacaa ttatcaagga aaaagtaaaa aacatatata tatatatatt 30720
 15 aactgatcta gggagctggc tcagcagtta agagttctgg ctgcccttgc ttcagatctt 30780
 gctttgatcc ccagcaccaca catgatggct ctcaactgta tctctgcttc caggggatcc 30840
 aacagcctct tctgacctcc atagacaaga cctagtcctc tgcaagagca ccaaagtctc 30900
 20 ttatctgttg atccatctct ctgacctcat gccagatcat taaaactac tggacactgt 30960
 cccattttac gaagatgtca ctgccagtc atttgccatg agtggatatt tcgattcttt 31020
 ctatgttctc acccttgcaa ttataagaa agatatctgc atttgtctcc tgagagaaca 31080
 aaggggtggag ggctactgag atggctctag gggtaaaggt gcttgccaca aaatctgaca 31140
 25 acttaagttt ggtcttggaa tccacatggt ggagagagag aagagattcc cgtaagttgt 31200
 cctcaaactt cccacacatg tgctgtggct tatgtgtaac cccaataagt aaagatagtt 31260
 ttaaactacta cataaggtag ggtttcttca tgaccccaag gaatgatgcc cctgatagag 31320
 30 cttatgctga aaccccatct ccattgtgcc atctggaaaag agacaattgc atcccggaaa 31380
 cagaatcttc atgaatggat taatgagcta ttaagaaagt ggcttggtta ttgcacatgc 31440
 tggcggcgta atgacctcca ccatgatgtt atccagcatg aaggtcctca ccagaagtca 31500
 35 tacaaactct cttaggcttc cagagtcgtg agcaaaaaaa gcacacctct aaataaatta 31560
 actagcctca ggtagttaac caccgaaaat gaaccaaggg agttctaata caaaaccact 31620
 tcccttccct gttcaaacca cagtgcctta ttatctaaaa gataaacttc aagccaagct 31680
 40 tttaggttgc cagtatttat gtaacaacaa ggcccgttga cacacatctg taactcctag 31740
 tactgggcct caggggcaga gacaggtgga gccctggagt ttgaattcca ggttctgtga 31800
 gaaactctgt ctgaaaagac aatatggtga gtgaccggg aggatatctg atattgactt 31860
 ctggccaaca cacagccatc tctgcacatc tgtagttgca agccttttgc actaagtttg 31920
 45 gccagagtca gagtttgcaa gtgtttgtgg actgaatgca cgtgttgctg gtgatctaca 31980
 aagtcacctt ccttctcaag ctagcagcac tggcttcggc cagctgctca ttcaagcctc 32040
 tttgcagagt catcacgggg atgggggagc agggcccttc cctagaacac caagcctgtg 32100
 50 gttgtttatt caggacatta ttgagggcca agatgacaga taactctatc acttgccaa 32160
 cagtcgggtg ttgcggtgtt aggtattctc tgtgtctgca gaaaacagtg caacctggac 32220
 aaaagaaata aatgatatca tttttcattc aggcaactag attccgtggt acaaaaaggct 32280
 55 ccctggggaa cgaggccggg acagcggggc tctgagtcg ctatttccgt ctgtcaactt 32340
 ctctaactct ttgatttctt ccctctgtct gtttccctcc tcttgctggg gccagtgga 32400

60

65

ES 2 272 093 T3

gtctgtgtac tcacagggag gaggggtggca aagccctggt cctctacggg ctggggggaag 32460
 gggggaagct gtcggcccag tgactttttc ccctttctct ttttcttaga aaccagtctc 32520
 5 aatttaagat aatgagtctc ctcatcaccg tgtgctcact attcataggg acttatccac 32580
 ccccgccctg tcaatctggc taagtaagac aagtcaaatt taaaagggaa cgtttttcta 32640
 aaaatgtggc tggaccgtgt gccggcacga aaccagggat ggcggtctaa gttacatgct 32700
 10 ctctgccagc cccgggtgcct tttcctttcg gaaaggagac cgggaggtaa aacgaagttg 32760
 ccaacttttg atgatggtgt gcgccgggtg actctttaa atgcatcca tacctgggat 32820
 agggaaggct cttcagggag tcatctagcc ctccctcag gaaaagattc cacttccggt 32880
 15 ttagttagct tccacctggt cccttatccg ctgtctctgc ccactagtcc tcatccatcc 32940
 ggtttccgcc ctcatccacc ttgccctttt agttcctaga aagcagcacc gtagtcttgg 33000
 cagggtggcc attggtcact ccgctaccac tgttaccatg gccaccaagg tgtcatttaa 33060
 20 atatgagctc actgagtcct gcgggatggc ttggttggta atatgcttgc tgcaaaatcg 33120
 tgagaactgg agttcaattc ccagcacatg gatgtatttc cagcacctgg aaggcagggg 33180
 gcagagatct taaagctcct ggccagacag cccagcctaa ttagtaatca gtgagagacc 33240
 ctgtctcaag aaacaagatg gaacatcaaa ggtcaacctc ttgtctccac acacacaaat 33300
 25 acacacatgc acatacatcc acacacaggc aaacacatgc acacacctga acaccctcca 33360
 caaacacata cataaaaaaa taaatacata cacacataca tacatacacc aacattccct 33420
 ctcttagtc tcctgggtac gctcttgtca cccccactaa ggcttcaact tcttctattt 33480
 30 ctcatcttg actcctctgt actttgcatg ccttttccag caaaggcttt tctttaaate 33540
 tccgtcattc ataaactccc tctaaatttc tccccctgcc cttttctttc tctctagggg 33600
 gataaagaca cacactacaa agtcaccgtg ggaccagttt attcaccac ccaccctgc 33660
 35 ttctgttcat ccggccagct aagtagtcca acctctctgg tgtgtacce tggaccctgg 33720
 cttcaccaca gctcctccat gctaccagc cctgcaaacc ttcagcctag cctctggttc 33780
 tccaaccagc acaggcccag tctggcttct atgtcctaga aatctcctc attctctcca 33840
 40 tttccctcct gaatctacca ccttctttct cccttctcct gacctctaat gtcttgggtca 33900
 aacgattaca aggaagccaa tgaaattagc agtttggggg acctcagagt cagcagggga 33960
 gctgggatga attcacattt ccaggccttt gctttgctcc ccggattctg acaggcagtt 34020
 45 ccgaagctga gtccaggaag ctgaatttaa aatcacactc cagctgggtt ctgaggcagc 34080
 cctaccacat cagctggccc tgactgagct gtgtctgggt ggtagtgggt ctggtgggtg 34140
 tgggtgggtg ggtgggtggg gtgggtgggt tgggtgggtg ggtgggtggg tgtgtgtgtg 34200
 ttttctgctt ttacaaaact tttctaattc ttatacaaag gacaaatctg cctcatatag 34260
 50 gcagaaagat gacttatgcc tatataagat ataaagatga ctttatgcca cttattagca 34320
 atagttactg tcaaaagtaa ttctatttat acacccttat acatgggtatt gcttttgggtg 34380
 gagactctaa aatccagatt atgtatttaa aaaaaattc cccagtcctt aaaagggtgaa 34440
 55 gaatggaccc agatagaagg tcacggcaca agtatggagt cggagtgtgg agtcctgcca 34500
 atggtctgga cagaagcatc cagagagggg ccaagacaaa tgctctgcct cctaaggaac 34560
 60
 65

ES 2 272 093 T3

actggcagcc ctgatgaggt accagagatt gctaagtgga ggaatacagg atcagaccca 34620
 tggaggggct taaagcgtga ctgtagcagc cctccgctga ggggctccag gtgggcgccc 34680
 5 aaggtgctgc agtgggagcc acatgagagg tgatgtcttg gagtcacctc ggggtaccatt 34740
 gtttagggag gtggggattt gtggtgtgga gacaggcagc ctcaaggatg cttttcaaca 34800
 atggttgatg agttggaact aaaacagggg ccatcacact ggctcccata gctctgggct 34860
 10 tgccagcttc cacatctgcc ccccccccc tgtctggcac cagctcaagc tctgtgatc 34920
 tacacatcca aaagaggaag agtagcctac tgggcatgcc acctcttctg gaccatcagg 34980
 tgagagtgtg gcaagcccta ggctcctgtc caggatgcag ggctgccaga taggatgctc 35040
 15 agctatctcc tgagctggaa ctatcttagg aataaggatt atgcccgccc ggggttggcc 35100
 agcacccccag cagcctgtgc ttgcgtaaaa gcaagtgtctg ttgatttata taaaaacaga 35160
 gccgtggacc caccacaggg acaagtatgt atgcatctgt ttcattgata tgaaaagcga 35220
 cacaaccatt tttcacatca tggcatcttc ctaaccccc ttttttttg ttttgtttt 35280
 20 ttgagacagg gtttctctgt gtagtcctgg ctgtcctgga actcactttg tagaccaggc 35340
 tggcctcgaa ctcaaaaatc ctgggattaa aggtgtgtgc caccacgccc ggccctaacc 35400
 cccattctta atggtgatcc agtggttgaa atttcgggcc acacacatgt ccattagggg 35460
 25 ttagctgctg tcttctgagc tacctggtac aatctttata ccctggggcc tgggctcctg 35520
 atccctgact cgggcccgat caagtccagt tcctggggcc gatcaagtcc agttcctggg 35580
 cccgaacaag tccagtccct agctcgatta gctcatcctg gctccctggc ctgttcttac 35640
 30 ttacactctt ccccttgtc tggacttgtt gctttcttta ctcaagttgt ctgccacagt 35700
 ccctaagcca cctctgtaag acaactaaga taatacttcc ctcaagcag gaaagtccg 35760
 agtcaccaca ccctctggag gtgtgtggac acatgttcat gcgtgtgggt gcgcttacgt 35820
 35 acgtgtgc 35828

<210> 18

<211> 9301

40 <212> ADN

<213> *Homo sapien*

45 <400> 18

tagaggagaa gtctttgggg agggtttgc ctgagcacac ccctttccct ccctccgggg 60
 ctgaggggaaa catgggacca gccctgccc agcctgtcct callyctgg catgaagcag 120
 50 agaggggctt taaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa 180
 ggtggcgtgc cctcctctgg ctggtaccat gcagctccca ctggccctgt gtctcgtctg 240
 cctgctggta cacacagcct tccgtgtagt ggagggccag ggggtggcagg cgttcaagaa 300
 55 tgatgccacg gaaatcatcc ccgagctcgg agagtacccc gagcctccac cggagctgga 360
 gaacaacaag accatgaacc gggcggagaa cggagggcgg cctccccacc accccttga 420

60

65

ES 2 272 093 T3

	gaccaaaggt atgggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggttttaga	480
	aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagacca gtgaagattg ctggcctctg	540
5	ccagcactgg tcgaggaaca gtcttgccctg gaggtggggg aagaatggct cgctgggtgca	600
	gccttcaaat tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tggtgagagc ccagggcagg	660
	gaggacgctg gggtggtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag	720
10	aaaagaaaag gtttcaaaga atctcctcct gggaatatag gagccacgtc cagctgctgg	780
	taccactggg aaggaacaa ggttaaggag cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg	840
	caccggacac tctatgctgg tggtgctgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc	900
15	cccaggagggt gaacccccag ctggaagggg aagaacagg tcccaggcac tcagtaactt	960
	ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgatcca actgcaagat agccctggtg	1020
	tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca	1080
20	cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcacttgaa ggaatgggag	1140
	ttttcggcac agttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag	1200
	agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccacc cagtcccaac	1260
25	cttgcctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaacctt gggttcctgg tcaggcctgc	1320
	acagagaagc ccaggtgaca gtgtgatctt ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc	1380
	atgggggctg ctgaaatgac acttcagact aagagcttcc ctgtcctctg gccattatcc	1440
	aggtggcaga gaagtccact gcccaggctc ctggaccca gccctccccg cctcacaacc	1500
30	tgttgggact atggggtgct aaaaagggca actgcatggg aggccagcca ggaccctccg	1560
	tcttcaaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc	1620
	tgggctccag cgactgcctg aagggtgta aggaaccca acacaaaatg tccaccttgc	1680
35	tggactccca cgagaggcca cagccccga ggaagccaca tgcacaaac aaagtcatga	1740
	tctgcagagg aagtgcctgg cctagggggc ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct	1800
	tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc	1860
40	aaaccagccc acagaccaga aagcagccc agacgatggc agtggccaca tctccccctg	1920
	tgtgcttgct cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtcccctc tctggtttgg	1980
	tcttaagact attttcatc ctttcttgtc acattggaac tatccccatg aaacctttgg	2040
45	gggtggactg gtactcacac gacgaccagc tatttaaaaa gctcccacc atctaagtcc	2100
	accataggag acatggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc	2160
	tctgcctgcc cagggagtat caccatgagg cgcctattca gataacacag aacaagaaat	2220
	gtgccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtaggt tttgggtcag	2280
50	agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc	2340
	cccagcccag cctcccatgg atgctcgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa	2400
	ggtgctggga ccccagggaa gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc	2460
55	ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggttggac aactgcctt	2520
	tgattccttt caagtcta atgaattcctgt cctgatcacc tcccctcag tccctgcct	2580

60

65

ES 2 272 093 T3

	ccacagcagc tgcctgatt tattacctc aattaacctc tactccttc tccatcccct	2640
	gtccacccct cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcagaagg	2700
5	tgtgctgagt acttaccctg cccaggccag ggacctgcg gcacaagtgt ggcttaaatc	2760
	ataagaagac cccagaagag aatgataat aataatacat aacagccgac gctttcagct	2820
	atatgtgcca aatggtatTT tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttgg	2880
10	ggcggcccat tttgcagaca ggaagaagag agaggTTaag gaacttggcc aagatgacac	2940
	ctgcagtgag cgatggagcc ctgggtgttg aaccccagca gtcatttggc tccgagggga	3000
	cagggtgcg caggagagctt tccaccagct ctagagcatc tgggaccttc ctgcaataga	3060
15	tgttcagggg caaaagcctc tggagacagg cttggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga	3120
	gacgggcccg tccagggcag gggTggccag gcgggccc accctcacgc gcgcctctct	3180
	ccacagaagt gtccgagTac agctgcccgc agctgcactt caccgctac gtgaccgatg	3240
20	ggccgtgccg cagcgcCaag ccggTcaccg agctggTgtg ctccggccag tgcggcccgg	3300
	cgcgcctgct gcccCaagcc atcggcccgc gcaagtggTg gcgacctagt gggcccgact	3360
	tccgctgcat ccccgaccgc taccgcgcgc agcgcgtgca gctgctgtgt cccggTggTg	3420
	aggcgcgcg cgcgcgCaag gtgcgcctgg tggcctcgtg caagtgcaag cgcctcacc	3480
25	gcttccaca ccaTcgag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcgg ccgcagaagg	3540
	gccggaagcc gcggcccgc gcccgagcg ccaagcCa ccaaggccgag ctggagaacg	3600
	cctactagag cccgcccgc cccctccca ccggcggcg ccccgccct gaaccgcgc	3660
30	cccacattc tgtcctctgc gcgtggTtg attgtttata tttcattgta aatgcctgca	3720
	accagggca gggggctgag accttccagg ccctgaggaa tcccgggcgc cggcaaggcc	3780
	cccctcagcc cgcagctga gggTcccac ggggcagggg agggaaTga gagtcacaga	3840
	cactgagcca cgcagccccg cctctggggc cgcctacct tgcTggTccc acttcagagg	3900
35	aggcagaaT ggaagcattt tcaccgccct ggggtttta gggagcggTg tgggagTggg	3960
	aaagtccag gactggTta gaaagtTgga taagattccc ccttgacct cgctgccat	4020
	cagaaagcct gaggcgtgcc cagagcaca gactggggc aactgtagat gtggTttcta	4080
40	gtcctggctc tgccactaac ttgctgtgta acctgaaact acacaattct ccttcgggac	4140
	ctcaatttcc actttgtaaa atgagggTg aggtgggaat aggatctcga ggagactatt	4200
	ggcatatgat tccaaggact ccagtgcctt ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga	4260
45	gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattg attcagTgc aaggTcactt ccagaattca	4320
	gagTtgtgat gctctctct gacagcCa gatgaaaaac aaacagaaa aaaaaagtaa	4380
	agagTctatt tctggctgac atatttaccg ctgacaaaLi cctyyaayaa gctatgctgc	4440
50	ttcccagcct ggcttccccg gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaaataa	4500
	catcatccat tggggtagaa aaggagaggg tccgagggTg gtgggagggg tagaaatcac	4560
	atccgcccc aacttccaaa gagcagcate cctccccga cccatagcca tgttttaaag	4620
	tcaccttccg aagagaagtg aaaggTtcaa ggacactggc cttgcaggcc cgagggagca	4680
55	gccatcaca actcacagac cagcacatcc cttttgagac accgccttct gcccaccact	4740

60

65

ES 2 272 093 T3

	cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc	4800
	ttacactaaa agaataattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac	4860
5	tgcagagcat aatagctgcc acccaaaaat ctttttgaaa atcatttcca gacaacctct	4920
	tactttctgt gtagttttta attgttaaaa aaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca	4980
	tatgaaagcc tgcaggactg gtcgtttttt tggcaattct tccacgtggg acttgtccac	5040
10	aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttattttct cacttaagtt	5100
	atztatgcaa aagtttttct tgtagagaat gacaatgtta atattgcttt atgaattaac	5160
	agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag	5220
15	gatgtggtct cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc	5280
	tcttggtcac tagagctcca accttggaac cacctttgac tgctctctgg tggcccttgt	5340
	ggcaattatg tcttcctttg aaaagtcatg tttatccctt cctttccaaa cccagaccgc	5400
	atctcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tccttttagc agcctcccct	5460
20	ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcactc ccctgctcaa aagccttcca	5520
	tagctcccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggcccttctct	5580
	gcttgactcc cacctcccac tccaccaagc ttcctactga ctccaaatgg tcatgcagat	5640
25	ccctgcttcc ttagtttgcc atccacactt agcaccocca ataactaatc ctctttcttt	5700
	aggattcaca ttacttgtca tctcttcccc taaccttcca gagatgttcc aatctcccat	5760
	gatccccctc tcctctgagg ttccagcccc ttttgtctac accactactt tggttcctaa	5820
30	ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta	5880
	ctggcataga caacacaaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct	5940
	tcttcgaagt gtggatttga tgcctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggcc	6000
35	agcctcctgc acttctctca aagtctcgcc tccccaaagt gtcttaatag tgtgggatgc	6060
	tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgccctaa	6120
	ggtgggatgg tcaactggaa agctttaaata taagtccagc ctaccttggg ggaaccacc	6180
	cccacaaaaga aagctgaggt ccctcctgat gacttgtcag ttttaactacc aataaccac	6240
40	ttgaattaat catcatcatc aagtctttga taggtgtgag tgggatcag tggccggctc	6300
	cttctgggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagtgagcc cctgcagaaa atccatgcat	6360
	catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggtagga aacagagaca tcttccatcc	6420
45	ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgtgtt	6480
	tgtttgtttg ttttgagaca gagtctcgct ctattgccca ggctggagtg cagtgtcaca	6540
	atctcggctt actgcaactt ctgccttccc ggattcaagt gattctcctg cctcagcctc	6600
50	cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaatttttg tatttttgat	6660
	agagacgggg tttcaccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct	6720
	gcctgcctcg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccaca cccagcccca	6780
55	ggttgggtgt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaattgtt tgcccacagc	6840
	cataacttggg cttagttcct tgccttacc ctcaattgag ctgcttagaa cctggtgggc	6900

60

65

ES 2 272 093 T3

5 acatgggcaa taaccaggtc aactgtttt gtaccaagtg ttatgggaat ccaagatagg 6960
 agtaatttgc tctgtggagg ggatgaggga tagtggttag ggaaagcttc acaaagtggg 7020
 tgttgcttag agattttcca ggtggagaag ggggcttcta ggcagaaggc atagcccaag 7080
 caaagactgc aagtgcattg ctgctcatgg gtagaagaga atccaccatt cctcaacatg 7140
 taccgagtcc ttgccatgtg caaggcaaca tgggggtacc aggaattcca agcaatgtcc 7200
 10 aaacctaggg tctgctttct gggacctgaa gatacaggat ggatcagccc aggctgcaat 7260
 cccattacca cgagggggaa aaaaacctga aggctaaatt gtaggtcggg ttagaggtta 7320
 tttatggaaa gttatattct acctacatgg ggtctataag cctggcgcca atcagaaaag 7380
 gaacaaacaa cagacctagc tgggaggggc agcattttgt tgtagggggc ggggcacatg 7440
 15 tcttgggggt acagccagac tcagggcttg tattaatagt ctgagagtaa gacagacaga 7500
 gggatagaag gaaataggtc cctttctctc tctctctctc tctctctctc actctctctc 7560
 tctctcacac acacacacag acacacacac acgctctgta ggggtctact tatgctccaa 7620
 gtacaaatca ggccacattt acacaaggag gtaaaggaaa agaacgttgg aggagccaca 7680
 ggaccccaaa attcctgtt ttccttgaat caggcaggac ttacgcagct gggagggtgg 7740
 agagcctgca gaagccacct gcgagtaagc caagttcaga gtcacagaca ccaaaagctg 7800
 20 gtgccatgtc ccacaccgc ccacctcca cctgctcctt gacacagccc tgtgctccac 7860
 aaccgggctc ccagatcatt gattatagct ctggggcctg caccgtcctt cctgccacat 7920
 ccccacccca ttcttggaac ctgcctctg tcttctcctt tgtccaaggg caggcaaggg 7980
 ctgagctatt gggcagctt gaccaacagc tgaggctcct tttgtggctg gagatgcagg 8040
 25 aggcagggga atattcctct tagtcaatgc gaccatgtgc ctggtttgcc cagggtggtc 8100
 tcgtttacac ctgtaggcca agcgtaatca ttaacagctc ccacttctac tctaaaaaat 8160
 gacccaatct gggcagtaaa ttatatggtg cccatgctat taagagctgc aacttgctgg 8220
 30 gcgtggtggc tcacacctgt aatcccagta ctttgggacg tcaaggcggg tggatcacct 8280
 gaggtcacga gttagagact ggcctggcca gcatggcaaa accccatctt tactaaaaat 8340
 acaaaaatta gcaaggcatg gtggcatgca cctgtaatcc caggtactcg ggaggctgag 8400
 acaggagaat ggcttgaacc caggaggcag aggttgcagt gagccaagat tgtgccactg 8460
 ccctccagcc ctggcaacag agcaagactt catctcaaaa gaaaaaggat actgtcaatc 8520
 actgcaggaa gaaccagggt aatgaatgag gagaagagag gggctgagtc accatagtgg 8580
 35 cagcaccgac tcctgcagga aaggcgagac actgggtcat gggactgaa gggtgccctg 8640
 aatgacgttc tgctttagag accgaacctg agccctgaaa gtgcattgct gttcatgggt 8700
 gagagactaa attcatcatt ccttggcagg tactgaatcc ttctttaggg ctgcccctca 8760
 atgcccattt tcctacaat tgtctggggg gcctaagctt ctgccacca agagggccag 8820
 40 agctggcagc gagcagctgc aggtaggaga gataggtacc cataaggagg gtgggaaaga 8880
 gagatggaag gagaggggtg cagagcacac acctcccctg cctgacaact tcctgagggc 8940
 tggatcatgcc agcagattta aggcggaggc aggggagatg gggcgggaga ggaagtgaaa 9000
 45 aaggagaggg tggggatgga gaggaagaga ggggatcat tcattcattc cattgctact 9060
 gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccttagctct gggcatgtgg ttgtaatctt 9120
 ggagcctcat ggagctcaca gggagtgtg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa 9180
 50 ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctgggtg 9240
 agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag 9300
 55 c 9301
 65

ES 2 272 093 T3

	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
10	<400> 19	
	ccggagctgg agaacaaca g	21
15	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
25	<400> 20	
	gcactggccg gagcacacc	19
30	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
40	<400> 21	
	aggccaaccg cgagaagatg acc	23
45	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
55	<400> 22	
	gaagtcagg gcgacgtagc a	21
60	<210> 23	
	<211> 25	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 272 093 T3

	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
5	<400> 23	
	aagcttgga ccatgcagct cccac	25
10	<210> 24	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
20	<400> 24	
	aagcttctac ttgtcatcgt cgtccttgta gtcgtaggcg ttctccagct	50
25	<210> 25	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
35	<400> 25	
	gcactggccg gagcacacc	19
40	<210> 26	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
50	<400> 26	
	gtcgtcggat ccatggggtg gcaggcgttc aagaatgat	39
55	<210> 27	
	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
65	<400> 27	
	gtcgtcaagc ttctactgt catcgtcctt gtagctgtag gcgttctcca gctcggc	57

ES 2 272 093 T3

	<210> 28	
	<211> 29	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
10	<400> 28	
	gacttgatc ccaggggtgg caggcggtc	29
15	<210> 29	
	<211> 29	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
25	<400> 29	
	agcataagct tctagtaggc gttctccag	29
30	<210> 30	
	<211> 29	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
40	<400> 30	
	gacttgatc cgaaggga aagaaaggg	29
45	<210> 31	
	<211> 29	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
55	<400> 31	
	agcataagct ttaatac caa atcgatgga	29
60	<210> 32	
	<211> 33	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 272 093 T3

<220>
<223> Cebador para PCR

5 <400> 32
actacgagct cggccccacc acccatcaac aag 33

10 <210> 33
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador para PCR

20 <400> 33
acttagaagc ttcagtcct cagccccctc ttcc 34

25 <210> 34
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador para PCR

35 <400> 34
aatctggatc cataacttcg tatagcatac attatacgaa gttatctgca ggattcgagg 60
gcccct 66

40 <210> 35
<211> 82
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Cebador para PCR

50 <400> 35
aatctgaatt ccaccggtgt taattaaata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta 60
tagatctaga gtcagcttct ga 82

55 <210> 36
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>

65

ES 2 272 093 T3

<223> Cebador para PCR

<400> 36

5

acttaggtga cactatagaa ctcgagcagc tgaagcttaa ccacatggtg gctcacaacc 60

at 62

10

<210> 37

<211> 54

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

20

<400> 37

aacgacggcc agtgaatccg taatcatggt catgctgcca ggtggaggag ggca 54

25

<210> 38

<211> 31

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

35

<400> 38

ataccaccg gtgacaccg cttcctgaca g 31

40

<210> 39

<211> 61

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

50

<400> 39

55

attacttaat taaacatggc gcgccatatg gccggcccct aattgcgggc catcgttaat 60

t 61

<210> 40

60

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

<223> Cebador para PCR

ES 2 272 093 T3

<400> 40

attacggccg gccgcaaagg aattcaagat ctga

34

5

<210> 41

<211> 34

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

15

<400> 41

attacggcgc gccctcaca ggccgcaccc agct

34

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65