

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)

C07K 14/51 (2006.01) **A01K 67/027** (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)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.1999 E 99963986 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **13.04.2016 EP 1133558**

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 y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:

21.06.2016

73

Titular/es:

**UCB PHARMA S.A. (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Bruxelles, BE**

72

Inventor/es:

**BRUNKOW, MARY E.;
GALAS, DAVID J.;
KOVACEVICH, BRIAN;
MULLIGAN, JOHN T.;
PAEPER, BRYAN W.;
VAN NESS, JEFFREY y
WINKLER, DAVID G.**

74

Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 272 093 T5

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para incrementar la mineralización de la sustancia ósea

5 CAMPO TECNICO

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 INVENCION

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 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).

20 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 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 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.

35 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 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.

45 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.

50 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.

También se han sugerido dosis elevadas de calcio en la dieta, con o sin vitamina D para mujeres postmenopáusicas. 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 AI11311 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 INVENCION

La presente divulgación 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 que comprende el SEQ ID NO. 1, 5, 9, 11, 13 o 15, o una secuencia complementaria de la misma.

Dentro de los aspectos relacionados de la presente divulgación, 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 divulgan 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).

También son proporcionados por la presente divulgación 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).

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.

También se divulga que las proteínas mencionadas antes, o fragmentos de las mismas, pueden ser producidas como proteínas de fusión. Por ejemplo, en un aspecto se divulga 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. 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).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que se une a una proteína de unión TGF-beta codificada por un ácido nucleico de secuencia ID NO. 1, 5, 9, 11, 13 o 15 con una K_a mayor o igual a 10^8 M^{-1} y no se une a la proteína Dan o la proteína Gremlin. El anticuerpo puede, por ejemplo, ser de origen humano o murino.

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 por la divulgación hibridomas y otras células que son capaces de producir o expresar los anticuerpos anteriormente mencionados.

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).

En otros aspectos de la presente divulgación, 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 de la divulgación, 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 de la divulgación, el oligonucleótido tiene una longitud de al menos 15, 20, 30, 50, o 100 nucleótidos. En realizaciones adicionales de la divulgación, el oligonucleótido está marcado con otra molécula (v.g., una enzima, molécula fluorescente, o radioisótopo). Asimismo se proporcionan por la divulgación, 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).

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.

En otros aspectos de la presente divulgación, 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 por divulgación 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 por divulgación 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 divulgación, se proporcionan métodos para producir ribozimas o bien sintéticamente, o bien mediante transcripción in vitro o in vivo. En realizaciones adicionales de la divulgación, 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 divulgación, 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 diversos aspectos, 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 divulgación, 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 donde el ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID Núms. 1, 3, 5, 9, 11, 13 o 15 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 donde el ácido nucleico endógeno es un ácido nucleico que comprende la SEC IND NO. 1, 5, 9, 11, 13 or 15, 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 divulgación, 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 divulgación 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 de la divulgación, 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 divulgación, 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 de la siguiente divulgación, 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 de hueso o de los análogos del mismo se incluyen hidroxiapatita y muestras de hueso humano primario obtenidas mediante biopsia.

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 de la divulgación, 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.

Utilizando métodos tales como los divulgados 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.

- 5 En otros aspectos relacionados la divulgación 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 un anticuerpo o fragmento de anticuerpo
- 10 de la invención, en la fabricación de un medicamento para incrementar la mineralización ósea 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 anticuerpos (v.g., un anticuerpo humanizado) que reconocen específicamente y alteran la actividad de la proteína de unión al TGF-beta.
- 15 En otro aspecto la presente divulgación 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
- 20 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.
- En otros aspectos de la presente divulgación, 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.
- 25 En aspectos 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.
- 30 Entre los ejemplos representativos de las moléculas que pueden ser utilizadas en los contextos terapéuticos anteriormente mencionados se incluyen, anticuerpos (v.g., anticuerpos humanizados). Tales moléculas pueden ser utilizadas, dependiendo de su selección, para alterar, ejercer un efecto antagónico 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.
- 35 En varios aspectos 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.
- 40 Estos y otros aspectos de la presente divulgación 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 DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

- 45 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.
- 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
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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).
- 65 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.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

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 super-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).

"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.

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.

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.

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.

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 diagnósticos. Entre los ejemplos de las marcas se incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos, enzimas, y otros radicales marcadores.

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.

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.

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

Esclerosteosis es un término que fue aplicado por Hansen (1967) (Hansen, H.G., Sklerosteose. Opitz, H., Schmid, F., Handbuch der Kinderheilkunde. Berlin: 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.

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).

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).

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, (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, fosfatasas ácidas resistentes al ácido en plasma y galactosilhidroxilisina (ver Coomier, supra)).

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. 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.

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 los miembros novedosos 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 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

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 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 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.

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.

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 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 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.

LAS PROTEINAS MORFOGENICAS DEL HUESO (BMP) SON PROTEINAS REGULADORAS CLAVES EN LA DETERMINACION 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-traduccional 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).

10 PROTEINAS DE UNION 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 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 divulgación 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 divulgación 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 RNasa, 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).

Con el fin de amplificar las moléculas de ADNc clonadas, la genoteca deADNc es insertada en un huésped procariótico, 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 kea 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 divulgación 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 ratóns (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, 4ª 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, 2ª 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 GAL1 (galactosa), PGK (fosfoglicerato quinasa), ADH (alcohol deshidrogenasa), AOX1 (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 Ylp, tales como Ylp5, vectores YRp, tales como YRp17, vectores YE_p tales como YE_p13 y vectores YC_p, tales como YC_p19. 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 proteínas 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 de los mismos) son 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 Antisera", 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)).

Anticuerpos monoclonales para su uso en la invención pueden ser preparados mediante inmunización convencional y procedimientos de fusión celular. Fragmentos, pueden ser 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.

5 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.

10 Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante o diseñado genéticamente obtenido mediante el uso 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

15 secuenciar y manipular el ADN, por ejemplo, para introducir codones para crear restos 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

20 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

25 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.

30 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

35 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.

40 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

45 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, trietilenfosforamida, 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, daunorrubicina, mitomicinas (v.g. mitomicina C), actinomicinas (v.g. dactinomicinas), plicamicina, calicamicina y derivados de la misma, o

50 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 medroxiprogesterona), 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 hidroxiiurea, hidrazinas, tales como procarbazona, o imidazoles, tales como dacarbazina.

65 Son grupos efectoras particularmente útiles la calicamicina y los derivados de la misma (ver por ejemplo las Memorias de Patente Suraficanas 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}, Re¹⁸⁶, Co⁵⁸, Co⁶⁰, Cu⁶⁷, Au¹⁹⁵, Au¹⁹⁹, Au¹¹⁰, Pb²⁰³, Bi²⁰⁶, Bi²⁰⁷, In¹¹¹, Ga⁶⁷, Ga⁶⁸, Y⁸⁸, Y⁹⁰, Tb¹⁶⁰, Gd¹⁵³ y Sc⁴⁷.

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 dietilenti-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 α -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 MOLECULAS QUE INCREMENTAN LA DENSIDAD OSEA

Como se ha discutido antes, la presente proporciona métodos para seleccionar y/o aislar compuestos que son capaces de incrementar la densidad ósea. Por ejemplo, en un aspecto de la presentedivulgación 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 ciertos aspectos, 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 divulgación, 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 un divulgación 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 divulgación 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 divulgación, 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 divulgación 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 de la divulgación, 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 divulgación, 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 hidroxiapatita 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 divulgación 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.

MOLECULAS 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 divulgación 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 Agrafiotis 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-Thiazolidonone 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).

5 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 divulgación, se entiende que los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-idiotípicos y 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 divulgación 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 mecanismos 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 secrete 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 inmuno-electroforesis 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 Alting-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 híbrido 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 I 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.

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 divulgación, 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, 2^a 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 divulgación, 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.

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 deleción 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, deleción, 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 deleción o truncamiento de proteínas (v.g. una porción extracelular soluble) también pueden ser construidos utilizando sitios para endonucleasas de restricción convenientes adyacentes a la deleción 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 secuencia reconstruida resultante codifica un derivado que tiene la inserción, sustitución, o deleción de aminoácidos deseada.

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).

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.

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).

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).

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).

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.

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).

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 utilizar 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.

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.

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).

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 Ila 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.

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 de 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.

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., Stratagene, La Jolla, California).

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 marcador 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).

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 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.

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).

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).

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).

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, 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 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.

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 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 en la técnica.

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 Acido Nucleico

En otros aspectos de la divulgación, 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 de la divulgación 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 divulgación 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 divulgación 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 Phycobilli, 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 pareja de 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 FARMACEUTICAS

Como se ha observado antes, la presente divulgación 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, glutation 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 pueden ser preparadas para su administración mediante una variedad de rutas diferentes. Además, las composiciones farmacéuticas de 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.

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 divulgación 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 divulgación 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 Levvero 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 divulgación, 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 92:122-92126, 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 nucleicos 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 divulgación 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, fosfatasa ácida 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 ESCLEREOSTIOSIS 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 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 Afrikaner. 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

ESPECIFICIDAD DE TEJIDOS DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA PROTEINA DE UNION 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 Preamplification 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 (NH0st 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'-GCACTGGCCGGAGCACACC-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'-AGGCCAACC CGAGAAGATGA 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 μ l, 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 μ l 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 4^o 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 (prosencefalo), 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

EXPRESION Y PURIFICACION DE PROTEINA 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'-AAGCTTGGTACCATGCAGCTCCCAC-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'-AAGCTTCTACTTGTTCATCGTCGTCCT TGTAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCT-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 μ g/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 μ g 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'-GTCGTCGGATCCATGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAAT-GAT-3' (SEC ID NO: 26)

Cebador antisentido: 5'-GTCGTC AAGCTTCTACTTGT CATCGTCCTTGT-AGTCTAGGCGTTCTCCAGCTCGGC-3' (SEC ID NO: 27)

5 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.

10 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.

EJEMPLO 4

30 PREPARACION Y ENSAYO DE ANTICUERPOS POLICLONALES PARA BEER, GREMLIN, Y DAN

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:

Beer H

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

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

Gremlin H.

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

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

40 Dan H.

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

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

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).

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.

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).

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 µm (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 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-poli de burro conjugado con peroxidasa, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se realizó un ciclo final de 3X lavados de 1X TBS/TWEEN al 0,02% y las tiras fueron desarrolladas con Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

10 C. Ensayo de reactividad cruzada con anticuerpo:
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 lgy de 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
15 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.

20 EJEMPLO 5

INTERACCIÓN DE BEER CON PROTEÍNAS DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF-BETA

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
25 protocolo representativo es el siguiente. Se sometió a diálisis Beer parcialmente purificada en solución salina tamponada con HEPES (HEPES 25 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
30 500 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 (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

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 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
45 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). 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
50 proteínas son incubadas 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

55 ANALISIS DE RASTREO PARA LA INHIBICION DE LA UNION DE LA PROTEINA DE UNION 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 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
60 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 Beer, la solución es separada y el BMP unido es cuantificado como se ha descrito. Los
65 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 de 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 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).

EJEMPLO 7

INHIBICIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A TGF-BETA A LA MATRIZ DEL HUESO

La evaluación de la inhibición de la localización en la matriz del hueso (hidroxiapatita) se realiza utilizando modificaciones del método de Nicolas (Nicolas, V. Calcif Tissue Int. 57:206, 1995). Brevemente, la proteína de unión a TGF-beta marcada con 125 I es preparada como describe Nicolas (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 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.

EJEMPLO 8

CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A TGF-BETA

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.

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.

EJEMPLO 9

MODELOS ANIMALES-I

GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS QUE SOBREEXPRESAN EL GEN BEER

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 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 grosera, 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].

15 MODELOS ANIMALES II

DESORGANIZACION DEL GEN BEER DE RATON MEDIANTE RECOMBINACION HOMOLOGA

La recombinación homóloga en células madre (ES) embrionicas 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 con 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'-AATCTGGATCCATAAATTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGCAGGA

35 TTCGAGGGGCCCT-3' (SEC ID NO: 34); la secuencia del cebador anti-sentido era 5'-AATCTGAATTCCACCGGTGTTAATTA

TAATTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTAGAG 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'-

40 ATTTAGGTGACACTATAGAAGTTCGAGCAGCTGAA GCTTAACCACATGGTGGCTCACAAACCAT-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, Fsel, Ascl y Pacl. Específicamente, la secuencia del cebador efector era 5'-

55 ATTACCACCGGTGACACCC GCTTCCTGACAG-3' (SEC ID NO: 38); la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACTTAATTAACATGGCGCCATATGGCC 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.

60 El constructo dirigible al gen Beer de ratón también incluía un segundo marcador seleccionable, el gen de la timidina 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 inviables) 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

65 pSP1337 utilizando los cebadores que permiten la posterior clonación en los sitios Fsel y Ascl del "brazo largo"-plásmido vector TA. Para esta PCR, la secuencia del cebador efector era 5'-

ATTACGGCCGGCCGCAAAGG AATTCAAGA TCTGA-3' (SEC ID NO: 40); la secuencia del cebador antisentido era 5'-ATTACGGCGCGCCCTCACAGGCCGCACCC AGCT-3' (SEC ID NO: 41).

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

EJEMPLO 10

INACTIVACION 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 μg de oligonucleótido antisentido a 100 μl 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 μl) (Life Technologies, Gaithersburg MD) en los 100 μl 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

ES 2 272 093 T5

SECUENCIAS

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

AGAGCCTGTGCTACTGGAGGTTGGCGTGCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC
CTGCTGTAGACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAAATGATGCCACGGAAATCATCCC
CGAGCTCGGAGASTACCCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACACAAAGACCATGAAACCGGGCGGAGAACGGGGGGCC
CTCCCGACACCCCTTTGAGACCAAGAGCGTGTCCGAGTACAGCTGCCCGAGCTGCACCTTCACCCGCTACGTGACCGAT
GGCCCGTGGCGCAGGCCAAGCCGGTCAACGAGCTGTGTGTCTCCGGCCAGTGGGGCCGGCGCCCTGCTGCCAACGC
CATGGGCGCGGCAAGTGGTGGGACCTAGTGGGCGGACTTCCGCTGCATCCCGAGCCGCTACCGCGCGCAGCGCTGC
AGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGGGGCGCGCGCGCGCAGGTGGCCCTGGTGGCTGCTGCAAGTGCAGAGCCCTCACC
CGCTTCCACAGCCASTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCGGCTCGGCCGAGGAGGGCCGAGCCGGGCGCCG
CGCCCGGAGGCGCAAGCCAAACAGCCGAGCTGGAGAACCCCTACTAGAGCCCGCCCGCGCCCTCCCAACCGCGGGC
GCCCGGGCCCTGACCCCGCGCCCAACATTTCTGTCTCTGCGGCTGTTTGAATGTTTATATTTTATTGTAATGCCTGC
AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGGCAAGGCCCGCCCTCAGCCCGCAGCTG
AGGGTCCACCGGGCAGGGGAGGGAAATTGAGAGTCAAGACACTGAGCCAGCGAGCCCGCCCTCTGGGGCCGCTACT
TTGCTGGTCCCACTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTACCGCCCTGGGTTTTTAAAGGAGCGGTGTGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTTACTTGTGTGTAACCTTGAAC
TACACAATTTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCGAGGTTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGATGAAATG
CAGTTGCATTGATTCAGTGCCAAAGSTCACTTCCAGAATTGAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGTGAAGAA
CAAAACAGAAATAAAGTAAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAAACTCCTGGAGAAAGCTATGCTG
CTTCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCAACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACTTCCGAAGAGAAGTAAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCCGAGGGAGC
AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGGAGACCCGCTTCTGCCCACTCACGGACACATTTCTGCCT
AGAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATTGGGGGAAAAACTACAAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAAATCTTTTGAAGAAATCATTCCAGACACCTC
TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATGTTAAAAAAAAGTTTTAAACAGAAACACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
GGTGGTTTTTTTGGCAATCTTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTGTAGAGAATGACAAATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

5

ES 2 272 093 T5

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

MLQFLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDAT E I I FELGEYEEFFEELENNKTMNRAENGGRE FHHF FETHKDVSEYSC
RELHFTRYVTDGFCRS AKPVTELVCSGQCGFARLLFN AIGR GKWRFSGDFRCI FDRYRAQRVQLLFCGGEAERARKVR
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

5

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

AGAGCCTGTGCTACTGGAGGTTGGCGTGCCTCCTCTGGCTGGTACCAATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTGTCTGC
CTGCTGGTACACACASCTTCCGTGTAGTGGAGGGCTAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCTC
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACACACAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGGGGC
CTCCCCACACCCCTTTGAGACCAAGAGCTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTACCCCGCTACGTGACCGAT
GGCCCGTGCAGAGCGCCAAAGCCGGTCAACGAGCTGGTGTGCTCCGCGCAGTGCAGCCCGGGCGGCTGCTGCCAACGC
CATCGGCCGCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCTGC
AGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGGAGCGCCCGCGCGGCAAGGTGGCCCTGGTGGCCCTGTGCAAGTGCAGCGCTCACC
CGCTTCCACAAACAGTCCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCGCTCGGCGCAGAAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCCAAAGCCAAACAGGCGAGCTGGAGAACGCGCTACTAGAGCCCGCCCGGCGCCCTCCCCACCGCGGGC
GCCCGCGCCCTGAACCGCGCCCGCCACATTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTTATTGTAARTGCCTGC
AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGTCCACGGGCGAGGGAGGGATTGAGAGTACAGACACTGAGCCACCGAGCCCGCCCTCTGGGGCCGCTACCT
TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAAGAAATGGAAGCATTTCACCGCCCTGGGTTTAAAGGAGCGGTGTGGAGTGG
GAAAGTCCAGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCATCAGAAAGCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAACTTGTGTGTAACCTTGAAC
TACACAAATCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAATGAATG
CAGTTGCATTGATTCAGTGCCAAAGGTCACTTCCAGAAATTCAGAGTTGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAAA
CAAAACAGAAAAAAGTAAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAAACTCCTGGAAAGAGCTATGCTG
CTTTCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCA ACTTCCCAAGAGCAGCATCCCTCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTACCTTCCGAAAGAGAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCCGAGGGAGC
AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGGAGACCCGCTTCTGCCACCACCTCACGGACACATTTCTGCCT
AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTTATGGGGAAAAACTACAAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTTGAATAATCATTTCCAGACAACCTC

ES 2 272 093 T5

TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAABAAAGTTTTTAAACAGAAACACATGACATATGAAAAGCCTGCAGGACT
GGTCGTTTTTTTGGCAATTCCTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTTCTTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

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

MLFLALCLVCLLVHTAFRVVEG*

5

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

AGAGCCTGTGCTACTGGAAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGSSGTGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCATCTSC
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGGCTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCG
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACAACAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGGGC
CTCCCACCAACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACCTTCACCCGCTACGTGACCGAT
GGSCCTGCGCGACGCCAAAGCCGCTCACCGAGCTGGTGTGCTCCGSCCAGTGGSCCCGGCGGCTGCTGCCCAAGSC
CATCGGCCGCGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC
AGCTGCTGTGTCCGSGTGGTGGGCGCCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGTTGGCCTCGTSCAAGTGCAGCGCCTCAC
CGCTTCCACAACCAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCGAGAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCCGAGCGCCAAAGCCAACCAGGCCGAGCTGGAGAAGCCTACTAGAGCCCGCCGCGCCCTCCCAACCGCGGGC
GCCCGGSCCTGAACCCGCGCCCAATTTCTGTCTCTGCGGTGGTTTTGATTGTTTTATTTTCATTSTAAATGCCTGC
AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGAATTGAGAGTACAGACACTGAGCCAGCAGCCCGCCTCTGGGCCGCTACT
TTGCTGGTCCCCTTCCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTCACCGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCTTGACCTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAATTGCTGTGTAACTTGPAC
TACACAATTCTCTTCCGGACCTCAATTTCCACTTTGTAATAAGAGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTTCAAGGACTCCAGTGCCTTTGAAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAATGAATG
CAGTTGCATTGATTCAGTGCCAAGGTCACTTCCAGAAATTCAGAGTTGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA
CAAAACAGAAAAAAGTAAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTG
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCTCCATCTCAAAGAAATACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCAACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTACCTTCCGAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCCGAGGGAGC

AGCCATCAGAAACTCAACAGACCAGCACATCCCTTTTGGAGACCCGCTTCTGCCCACTCAGGACACATTTCTGCCT
AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGATATTTATGGGGAAAAACTACAGT
GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAATCTTTTTGAAAATCATTTCCAGACACCTC
TTACTTTCTGTGTAGTTTTAATTGTTAAAAAABAAAGTTTTTAAACAGAAAGCACATGACATATGAAAAGCCTGCAGGACT
GGTCGTTTTTTGGCAATTCCTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTTCTTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

ES 2 272 093 T5

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

MQLFALCLICLLVHTAFRVVGGQGWQAFKNDAT E I I R E L G E Y F E F F E L E N N K T M N R A E N G G R F P H H F F E T K D V S E Y S C
R E L H F T R Y V T D G E C R S A K E V T E L V C S G Q C G F A R L L E N A I G R G H W W R E S G F D F R C I F D R Y R A Q R V Q L L C F G G E A F R A R K V R
L V A S C K C K R L T R F H H Q S E L K D F G T E A A R F Q K G R K F R E F A R S A K A N Q A E L E N A Y

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

5

AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC
CTGTCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGSGTGGCAGGCGTTCAAGAAATGATGCCACGGAAATCATCCG
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACAAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGGC
CTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGGAGCTGCACCTTACCCGCTACGTGACCGAT
GGGCGTGGCCAGCGCAAGCCGGTACCGAGCTGGTGTGCTCGGGCAGTGGGCCCCGGCGCGCTGCTGCCCAAGCG
CATCGGCCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCSCGAGCGCGTGC
AGCTGCTGTGCCCGGTGGTGGAGCGCCGCGCGCGCAAGGTGGCCTGGTGGCTCGTGCAAGTGAAGCGCCTCACC
CGCTTCCACAACCAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGCCGCTCGGCCGAGAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCAAGGCCAACCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCCTACTAGAGCCCGCCGCGCCCTCCCCACCGGGCGGGC
GCCCGGCCCTGAACCCGCGCCCAATTTCTGTCTCTGCGGTGGTTGATTGTTTATATTTTCAATTGTAATGCCTGC
AACCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCGGGGCGCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTCAAGACACTGAGCCACGCAGCCCCGCTCTGGGGCCGCTACCT
TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTACCGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAATTGCTGTGTAACCTTGAAC
TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGPAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCPAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGA,GAAPAGAGAGAGAATGAATG

ES 2 272 093 T5

CAGTTGCATTGATTCAGTGCCAAAGTCCACTTCCAGAAATTCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA
CAAAACAGPAAAAAAGTAAAGTCTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACCTCTGGAAAGAGCTATGCTG
CTTCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCGG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACTTCCGAAGAGAAGTGAAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAAGCCCGAGGGAGC
AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGGAGACACCGCCTTCTGCCACCCTCAGCGACACATTTCTGCCT
AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATTGGGGGAAAAACTACAAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGCATAATAGCTGCCACCCAAABAATCTTTTTGAAAATCATTTCAGAGCAACCTC
TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATGTTTAAAAAABAAAGTTTTTAAACAGAGGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
GGTGGTTTTTTTGGCAATCTTCCAGTGGGACTTGTCCACAGAAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACT
ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTTCTGTAGAGAAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAAATTA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

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

MQLFLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATETI IRELGEYFEFFFELENNKTMNRAENGGRFEHHEFETKDVSEYSC
RELHFTRYVTDGFCSRSAKEVTELVCSGQCGEARLLFNALIGRQKWWRFSGDFRCIFDRYRAQRVQLLCEGGAERARKVR
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARFQKGRKFRERARSAKANQAELENAY

5

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

ATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTTGTCTGCCTGCTGGTACACGCAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGTGGCA
GGCCTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCCCAGCTCGSAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACACAA
AGACCATGAACCGGGCGGAGAATGGAGGGCGGCTCCCCACCACCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGC
CGAGAGCTGCACTTACCCGCTACGTGACCGAAGGGCGGTGCCGACGCGCAAGCCAGTACCCGAGTTGGTGTGCTCCGG
CCAGTGGGCCCCGGCACGCCTGCTGCCAACGCCATCGGCCGCGCAAGTGGTGGCGCCGAGTGGGCCCCGACTTCCGCT
GCATCCCCAGCCCTACCGCGCGCAGCGTGTGCAGCTGCTGTGTCCCGGTGGTCCGCGCCGCGCGCGCAAGGTGCGC
CTGGTGGCCTCGTGCAAGTGAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGTCCCGAGGCCGC
TCGGCCGCAGAAGGGCCGGAAGCCGCGCCCCGCGCCCGGGGGCCAAAGCCAATCAGGCCGAGCTGGAGAAGCCCTACT
AG

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

MQLFLALCLVCLLVHAAFRVVEGQGWQAFKNDATETI IRELGEYFEFFFELENNKTMNRAENGGRFEHHEFETKDVSEYSC
RELHFTRYVTDGFCSRSAKEVTELVCSGQCGEARLLFNALIGRQKWWRFSGDFRCIFDRYRAQRVQLLCEGGAERARKVR
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGEAAREFQKGRKFRERARSAKANQAELENAY

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

ES 2 272 093 T5

ATGCAGCCCTCACTAGCCCGGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCACGCTTCCTTCTGTGCTGTGGAGGGCCAGGGGTG3CA
AGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTCAATCCCAAGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAAACAACAGACCA
TGAAACCGGGCGGAGATGSAAGCAGACCTCCCAACCATCCCTATGACGCCAAAGGTGTGTCCGAGTACAGCTGCCGGAG
CTGCACTACACCCGCTTCTGTACAGACGGCCCATGCCGCAAGGCCAAAGCGGTACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTG
CGGCCCGGGCGGCTGCTGCCAAGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAAGGACCGGATTTCCGCTGCATCC
CGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGACGCTGCTGTGCCCGGGGGCGCGCGCCGCGCTCGGGCAAGGTGCGTCTGGTG
GCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCACTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCGGGAGACCGCGGGCC
GCAGAAGGGTCGCAAGCCCGGGCCCGGGCGCCCGGGAGCCAAAGCCAAACAGGCGGAGCTGGAGAACGCCTACTAGAG

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

MQESLAEFLICLLVHAAFCAVEGQGWQAFRNDATEVI FGLGEYFEFF FENNIQTMNRÆENGRF FHHEYDAKDVSEYSCRE
LHYTRFLTDFECSRSAKEVTELVCSGQCQCFARLLENFNAIGRVKWRWENGDFRCIFDRYRAQRVQLLCEGGAAPRSRKRVLV
ASCKCKRLTRFHNQSELKDFGFETAREFQNGRKPREFARGAKPNQAELENEY

5

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

GAGGACCGAGTGCCCTTCCTCCTTCTGGCACCATGCAGCTCTCACTAGCCCTTGCCCTTGCTGCCTGCTTGTACATGCA
GCCTTCGTGTGCTGTGGAGAGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAAGAATGATGCCACAGAAATCAATCCGGGACTCAGAGAGTA
CCCAGAGCCTCCTCAGGAAGTAGAGAAACAACAGACCATGAAACCGGGCCGAGAACGGAGGCAGACCCCCCACCATCCTT
ATGACACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCGTGACCGACGGCCCGTGCAGT
GCCAAGCCGGTACCGAGTTGGTGTGCTCGGGCAGTGGCGCCCGCGGGCTGCTGCCAAGCCATCGGGCGCGTGA
GTGGTGGCGCCGAAACGGACCCGACTTCCGCTGCATCCCGATCGCTACCGCGCGCAGGGGTGCAGCTGCTGTGCCCG
GCGGCGGGCGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGCTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAG

10

ES 2 272 093 T5

TCGGAGCTCAAGGACTTCGGAGCTGAGACCGCGCGCGCGCAGAGGGTGGCAAGCGCGGCCCGCGCCCGGGGAGGCGG
AGCCAAACCAGGCGGAGCTGGAGAAACGCCTACTAG

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

!QLSLAFCLACLLVHAAAFVAVESQSWQAFNHDAETETIEGLREYFEFFQELNNQTMHRAENGGRFPHHEYDTRDVEYET
RELHYTRFVTDGFCRSAREVTELVCSGQCGEARLLFNALGRVKWREHGFDFRCIFDRYRAQRVQLLCEGGAAERSRVRA
LVASCKKRLTRFHNQSELKDFGEEETARFQGRKFRFRARGAKAHQAELENAI

5

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

AGAAATGATGCGAGAGAAATCATCCCCGAGCTGGGCGAGTACCCCGAGCCTCTGCCAGAGCTGAACAACAGACCATGAAC
CGGGGAGAAAGGAGGAGACCTCCCCACACCCCTTTGAGACCAAGAGCGCCTCCGAGTACAGCTGCCGGGAGCTGCA
ATTCAAGCGCTAGCTGACCGATGGGCGGTGCCGAGCGCCAGCCGGTCAACCGAGCTGGTGTGCTCGGGCCAGTGGCGCC
CGATGGGCGCTGCTGCCCAAGCCATCGGCGCGCGCAAGTGGTGGCGCCCAAGCGGGCCGACTTCGGCTGCATCCCCGAC
GCTAGCGCGCGAGCGGGTGCAGCTGTTGTCTCCTGGCGCGCGCGCGCGCGCAAGSTGCGCCTGGTGGCCTC
GTATAGTGTAGCGCCCTCACTCGCTTCCACAACCAAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGCGCGAGGCGCGCGCGCGCAAA
CGGCGCGGAAAGCTGGCGCCCGCGCGCGGGGSCACCAAGCCAGCCGGGCGCA

10

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

!IDATEIIEFELSEYEEFELPELNKTMHRAENGGRFPHHFFETKDASEYSRELHFTRYVTDGFCRSAREVTELVCSGQCGF
ARLLFNALGRVKWREHGFDFRCIFDRYRAQRVQLLCEGGAAFRARKVRLVASCKKRLTRFHNQSELKDFGPEAAAREQT
GRKLRERARGTKASNA

15

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

CGCGTTTTGGTGAGCAGCAATATTGCGCTTCGATGAGCCTTGGCGTTGAGATTGATACCTCTGCTGCACAAAAGGCAATC

GACCGAGCTGGACCAGCGCATTCGTGACACCGTCTCCTTGGAACTTATTCGCAATGGAGTGTCAATTCATCAAGGACNGCC
 TGATCGCAATGGTGCTATCCACGCAGCGGCAATCGAAABCCCTCAGCGGCTGACCAATATCTACAACATCAGCCTTGGT
 ATCCTGCGTGATGAGCCAGCGCAGAAACAAGGTAACCGTCACTGCGGATAAGTTCAAAGTTAPACCTGGTGTGATACCAA
 CATTGAAACGTTGATCGAAACCGGCTGAAABACGCTGCTGAATGTGCGCGCTGGATGTCACAAAGCAATGGCAGCAG
 ACAAGAAAGCGATGGATGAACTGGCTTCCATATGTCGGCAGCGCCATCATGATGGAAATGTTCCCGGGTGGTGTATCTGG
 CAGCAGTGGCGTGGATAGTATGCAATTGATAATTATTATCATTTCGGGGTCCCTTCCGGCGATCCGCCTTGTACGGGGC
 GCGGACCTGCGGGTTTTCGCTATTATGAAAATTTTCCGGTTTTAAGGCGTTTCCGTTCTTCTTCTCATAACTTAATGT
 TTTTATTTAAATACCCTCTGAAABGAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAAGCGAGCTTTTTGGCCCTCTGTCTTTCTTTCT
 TCTGTTTTTGTCCGTGGAAATGACCAATGGAAAGTCAACAAABAGCAGAGCTTATCGATGATAAGCGGTCAAACATGAGAAT
 TCGCGGCGGCATAATACGACTCACTATAGGGATCGAGGCCTACTCCCGCGCATGAAGCGGAGGAGCTGAACTCCGCATG
 CCCAGAGACGCCCCCAACCCCAAGTGCTGACCTCAGCCTCTAGCAGCTCTGGCTTGGGCTTGGGGGGGGTCAAGGC
 TACCACGTTCTCTTACAGGTGGCTGGGCTGTCTCTTGGCGCGCGCTCATGTGACAGCTGCTAGTTCTGCAGTGAGGTC
 ACCGTGGAAATGTCGCTTCCGTTGCCATGGCAACGGGATGAGGTTACATCTGGGTGTGGASCTTTTCTGTCCGTTGTA
 GGAATCCAAATACCCTAAATACCCTAGAAAGAGGAAAGTAGCTGAGCCAAAGCTTTCCGCTTCTCCAGATAAAGTTTG
 ACTTAGATGGAAABACAAATGATTAAGACCCGAGCCATCTGAAABATTCCTCTAATTGCACCCTAGGAAATGTGTA
 TATTATTGAGCTCGTATGTGTTCTTATTTTTAAAAGAAAACCTTTAGTCATGTTATTAATAAGAAATTTCTCAGCAGTGGGA
 GAGAACCAATATTAAACCAAGATAAAAGTTGGCATGATCCACATTCAGGAAAGATCCAGCTTGGGTTTTCATGAATGTG
 AAGACCCCATTTATTAAGTCTAAGCTCTGTTTTGCACACTAGGAAAGCATGGCCGGATGGCTGAGGGGCTGTAAAGG
 ATCTTTCAATGTCTTACATGTGTGTTTCTGTCTGCACTAGGACCTGCTGCTAGCCTGCAGCAGAGCCAGAGGGGTT
 TCACATGATTAGTCTCAGACACTTGGGGCAGGTTGCATGTACTGCATCGCTTATTTCCATACGGAGCACCTACTATGTG
 TCAAACACCATATGGTGTCACTCTTCAGAACGGTGGTGGTCAATCATGGTSCATTTGCTGACGGTTGGATTGGTGGTAGA
 GAGCTGAGATATATGGACGCACTCTTCAGCATTCTGTCAACGTTGGCTGTGCATTTCTTGTCTCTGAGCAAGTGGCTAAACA
 GACTCACAGGGTCAGCCTCCAGCTCAGTCGCTGCATAGTCTTAGGPAAGCTCTCCAGTCTCCCTACCTCAACTATCCA
 AGAAGCCAGGGGGCTTGGCGGTCTCAGGAGCCTGCTTGTGGGGACAGGTTGTTGAGTTTTATCTGCAGTAGGTTGCT
 AGGCATAGTGTACGACTGATGGCTGCCTTGGAGAACACATCCTTTGCCCTCATGCAAATCTGACCTTGACATGGGGC
 GCTGCTCAGCTGGGAGGATCAACTGCATACCTAAAGCCAAGCCTAAAGCTTCTTCCGTCACCTGAAACTCCTGGACCAAG
 GGGCTTCCGGCACATCCTCTCAGGCCAGTGAGGGAGTCTGTGTGAGCTGCACCTTCCAATCTCAGGGCGTGAGAGGCAGA
 GGGAGGTGGGGCAGAGCCTTGCAGCTCTTCCCTCCCATCTGGACAGCGCTCTGGCTCAGCAGCCCATATGAGCACAGGC
 ACATCCCCACCCCAACCCCACTTTCCGTCTGCAGAAATTAAGGCTCTGTTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGTCC
 TATCCTCTCTTAGGTAGACAGGACTCTGCAGGAGACACTGCTTTGTAAGATACTGCAGTTTTAAATTTGGATGTTGTGAGG
 GGAAGCGAAGGGCCTCTTTGACCATTCACTCAAGGTACCTTCTAACTCCCATCGTATTGGGGGGCTACTCTAGTGCTAG
 ACATTTGCAGAGAGCCTCAGAACTGTAGTTACCAGTGTGGTAGGATTGATCCTTCAGGGAGCCTGACATGTGACAGTTCCA
 TTCTTACCCAGTCAACCAACATTTATTCAGTACCTACCCCGTAAACAGGACCGTAGCAGGTAAGGAGGACCGGACT
 CAAAGAACTGACAGACCGAAGCCTTGAATATAAACACCAAAGCATCAGGCTCTGCCAACAGAACACTCTTTAACTCA
 GGCCCTTTAACTCAGGACCCCAACCCCAACCCCAAGCAGTTGGCACTGCTATCCACATTTTACAGAGAGGAAAACCTA
 GGCACAGGACGATATAAGTGGCTTGTAAAGCTTGTCTGCATGGTAAATGGCAGGGCTGGATTGAGACCCAGACATTCCA

ACTCTAGGGTCTATTTTTCTTTTTCTCGTTGTTTGGAACTCTGGGTCTTACTGGGTAAACTCAGGCTAGCCTCACACTCAT
ATCCTTCTCCCATGGCTTACGAGTGCTAGGATTCAGGTGTGTGCTACCATGTCTGACTCCCTGTAGCTTGTCTATACCA
TCCTCACACATAGGAATTGTGATAGCAGCACACACACCGGAAGGAGGTGGGAAATCCACAGAGGGCTCCGCAGGATG
ACAGGGGAATGCCTACACAGAGGTGGGGAAGGGAAGCAGAGGGAACAGCATGGGGGTGGGACCACAAGTCTATTTGGGG
AAGCTGCCGGTAACCGTATATGGCTGGGGTGAAGGGAGAGGTGATGAGATGAGGCAGGAGAGGCCACAGCAGGCAGCGGG
TAGGGGCTCCTTATTGCCAGAGGCTCGGATCTTCCTCCTCTTCTCCTCCGGGGGTGCCTGTTTCTATTTCCACCCTG
CCTCCCATCCAGGTCTGTGGCTCAGGACATCACCCAGCTGCAGAACTGGGCATCACCCACGCTCCTGAATGCTGCCGAGG
GCAGGTCCTTCATGCACGTCACACACCAGTGCTAGCTTCTACGAGGATTCCTGGCATCACCTACTTGGGCATCAAGGCCAAT
GATAGGCAGGAGTCAACCTCAGTGCTTACTTTGAAAGGGCCACAGATTTGATGACCAGGGCTGGCCCATAAAATGG
TAAGGACGCTACATTCGGCACCCTAGGAGCGTAAGCCCTCTGGGACCTGCTTCTCCAAAGAGGGCCCCACTTGAABAA
GTTCCAGAAAGATCCCAAAATATGCCACCPACTAGGGATTAAGTGTCTACATGTGAGCCGATGGGGCCACTGCATAT
AGTCTGTCCATAGACATGACATGGATAATAATATTTACAGCAGAGAGCAGGAGTTAGGTAGCTGTGCTCCTTCCCTT
TAAATGAGTGTGCCATTTTTTATTATGATGTGTATACATGTGTGTGCACACATGCCATAGGTTGATACTGAACCC
GTCTTCAATGTTTCCCAACCCACTTATTTTTGAGGCAGGGTCTCTTCCCTGATCCTGGGGCTCATTGGTTTTATCTAG
GCTGTGTCAGTGAAGCTCTGGAGTTCTGCTTTTTCTACCTCCCTAGCCCTGGGACTGCAGGGGCATGTGCTGGGCCAG
GCTTTTATGTGGCTTGGGGATCTGAACCTTAGGTCCTAGGCCTGAGCACCGTAAAGACTCTGCCACATCCCCAGCCTGT
TTGAGCAAGTGAACCATTCGCCAGTATTCGCCAGTGGGGCTTCTTACCCCTTTTATTGGCTAGGCATTCATGAGTGGTC
ACCTCCGCAGAGGAATGAGTGGCCACGACTGGCTCAGGGTCAGCAGCCTAGAGATACTGGGTTAAGTCTTCTGCCGCTC
GCTCCCTGCAGCCGAGACAGAAAGTAGGACTGAATGAGAGCTGGCTAGTGGTCAGACAGGACAGAAAGGCTGAGAGGCTC
ACAGGGCAGATGTCACAGAGCAGACAGGTTCTCCCTCTGTGGGGAGGGGTGGCCCACTGCAGGTGTAATTGGCCTTCT
TTGTGCTCCATAGAGGCTTCTGGGTACACAGCAGCTTCCCTGTCTGTTGATTCCTCAAAGAGAACTCCCTACCCTGGA
CTTACAGAGTCTATTGACTGGTGTAAACGGTTCAACAGCTTTGGCTCTTGGTGGAGGGTGCATACTGCTGTATCAGCTC
AAGAGCTCATTACGAAATGAACACACACACACACACACACACACACACACACAAAGCTAATTTTATATGCCTTAACTA
GCTCAGTGAAGTGGCCATTTCTGAACATCCCTGAAGTTAGCAGACATTTCCCTCTGGTGTCTTGGCTTAACACCTTCTAA
ATCTATATTTTATCTTGTGCTGCCCTGTACCTTCTGAGAAGCCCTAGGGCCACTTCCCTTCGCACCTACATTGCTGGAT
GGTTTCTCTCCTGCAGCTCTTAAATCTGATCCCTCTGCCTCTGAGCCATGGGAACAGCCCAATAACTGAGTTAGACATAA
AAACGCTCTAGCCAAAACCTCAGCTAAATTTAGACAATAAATCTTACTGGTGTGGAAATCCTTAAGATTCTTCATGACC
TCCTTACATGGCAGGATGAAAGCTTTATTACAATTGTTTATTGATCAAACCTAACTCATAAAAAGCCAGTTGCTTTT
ACCTGCTCAAGGAAGGAACAAATTCATCCTTAACTGATCTGTGCACCTTGCACAATCCATACGAATATCTTAAGAGTAC
TAAGATTTTGGTTGTGAGAGTCACATGTTACAGAATGTACAGCTTTGACAAGGTGCATCCTTGGGATGCCGAAGTGAAGCT
GCTGTTCCAGCCCCCTACCTTCTGAGGCTGTTTTGGAAGCAATGCTCTGGAGCAACTTTAGGAGGTAGGATGCTGGAAC
AGCGGGTCACTTCAGCATCCCGATGACGAATCCCGTCAAAGCTGTACATTCTGTAACAGACTGGGAAAGCTGCAGACTTT
AAGGCCAGGGCCCTATGGTCCCTCTTAACTCCCTGTACACCCCAACCCGAGCCCTTCTCCTCCAGCCGTTCTGTGCTTCTC
ACTCTGGATAGATGGAGAACACGGCCTTGCTAGTTAAAGGAGTGAAGGCTTACCCCTTCTCACATGGCAGTGGTTGGTACAT
CCTCATTACGGGAACCTCTGGGCACTTCTGCCTTACTTCTCTTTTTGGACTACAGGGAATATATGCTGACTTGTTTTGA
CCTTGTGATGGGGAGACTGGATCTTTGGTCTGGAATGTTTCTGCTAGTTTTTCCCAATCCTTTGGCAACCCTATCTA

TATCTTACCACTAGGCATAGTGGCCCTCTTCTGGAGCCCTTCAGGCTGGTTCTCGGGGACCATGTCCCTGGTTTCT
CCCCAGCATATGTTGTTACAGTGTTCACCTGCGGGTGGTTGCTGAACAPAGCGGGGATTGCATCCAGAGCTCCGGTGGC
TTGTGGGTACACTGCTAAGATAAAATGGATACTGGCCTCTCTCTGACCCTTGCAGAGCTCTGTTGCCCTGTGGGTACAC
TGCTAAGATAAAATGGATACTGGCCTCTCTCTATCCACTTGCAGGACTCTAGGGAACAGGATCCATTACTGAGAAAACC
AGGGGCTAGGAGCAGGGAGGTAGCTGGGCAGCTGAAAGTGTGGGGACTAACCAATGAATACCAGAGTTTGGATCTCTAG
AATACTCTTAAATCTGGTGGGAGAGTGGCCTGCTCTAATCCAGAACTCGGGAGGGGAGACAGGGAATCTCAGAA
GCAAACTGGCTAACCAGAAATAGCAAAACACTGAGCTCTGGCTCTGTGAGAGATCCTGCCCTTAACTATAAGAGAGAGAA
TAAAACATTTGAGAGACAGTAGATGCCAATTTTAAAGCCCGCAGATGCACATGGACAAGTGTGGTTTGAAGACACATAT
GCACCTCATGTGAAACAGGCATGCACACTCGGGCTTATCACACACATATTTGAAGAGAGAGTGGAGAGGAGAGTGCAC
ATTAGAGTTCACAGGAAAGTGTGAGTGGACACACCCATGCACACAGACATGTGTGCCAGGGAGTAGGAAGGAGGCTGGG
TTTGTGTATAAGAGGGAGCCATCATGTGTTTCTAAGGAGGGCTGTGAAGGAGGGCTTGTGTGGGCTGGGACTGGAGCAT
GGTTGTAAGTGGCTGGCTCCCTGTGGGAAACAGGAGGGTGGCCACCCCTGCAGAGGGTCCCACTGTCCAGGGGATCACT
AAAGCCCTGCTGAGAGCTTTAGGTATAGCCAGAGAGAGAAAGTAGGAAAGTGGGGGACTCCCATCTCTGATGTAG
GAGGATCTGGCAAGTAGAGGTGGCTTGGAGTAGAAGAGGGGTGCAGAGGAGATGCTCTTAAATCTGGGTCCAGCAGTT
TCTTTCCAAATATGCTGTGAGGAGGTGTAGGTGGTGGCTTCACTCACTCAGCAGAGGGGTGATGATGCCCGTGGAA
TGCTGGAAATGGCCAGCATCAACCCCTGGCTCTGGAAGACTCCATCTTTCAGAAAGGAGTGGATCTGTGTATGGCCAG
CGGGGTACAGGTGCTTGGGGCCCTGGGGGACTCCTAGCACTGGGTGATGTTTATCGAGTGCTCTTGTGTGCCAGGCAC
TGGCCTGGGGCTTGTCTCTCTGTTTGTCTTTTGGAGACAGACTCTTGTATGTATCCGTGTCAATCTTGG
AATCTCACTGCATAGCCAGGCTGCGAGAGAGGGGAGGGCATAAGCCCTTGTAAAGCAAGCCACTTCCAGAGACTAGAC
TCCACCCTGGAAATGATGACAGGTCAAGAGCTGAGTTCGGGAAGATTTTTTTTCCAGCTGCCAGGTGGAGTGTGGAGTGGC
AGCTAGCGGCAAGGGTAGAGGGCGAGCTCCCTGTGCAGGAGAAATGCAAGCAAGAGATGGCAAGCCAGTGAATTAAGCAT
TCTGTGTGGGAGCAGGTGGATGAAGAGAGAGGCTGGGCTTTCGCCCTCTGGGGGGGGGTGAGGGGTGGGGATGAGGTGA
GAGGAGGGCAGCTCCCTGCAGTGTGATGAGATTTTCTGACAGTGACCTTTGGCCTCTCCCTCCCCACTTCCCTTCTT
TCCTTTCTTCCACCATTGCTTTCCTTGTCTTGGAGAAATCTGAGTTTCCACTTCACTGGTGATGCAGACGGAAACAGAA
AGCCGT
GTATGTGTGTGAGTGGGAATGGCTCATAGTCTGCAGGAAAGTGGGCAGGAAGGAATAAGCTGTAGGCTGAGGCAGTGTGG
GATGCAGGGAGAGAGGAGAGGGATACCAGAGAAAGAAATAAGGGAGCTACAAGAGGGCATTGTTGGGGTGTGTGTG
TGTGTGTGTTGTTATATTTGATTTGGAAATACATTTCTTTTAAAAAATACTTATCCATTTATTTATTTTATGTGCACGT
GTGTGTGCTGCATGAGTTCATGTGTGCCACGTGTGTGCGGGAACCCCTTGGAGGCCACAAGGGGGCATCTGATCCCTGG
AACTGGAGTTGGAGGAGGTTGTGAGTCCCTGACATGTTGCTGGGAAGTGAACCCCGTCCATGCAAGAGCAGGAAGT
GCAGTTATCTGCTGAGCCATCTCTCCAGTCCCTGAAATCCATTTCTTAAAAATACACGTGGCAGAGACATGATGGGATTTA
CGTATGGATTTAATGTGGGGTCAATTAAGTTCGGGCACAGGCAAGCACCTGTAAAGCCATCACCCACACCGCAACAGTGA
ATGTGACCATCACCCCATGTTCTTATGTCAGTGAAGTCAACAGCCTGCACCCCTTCCCTGGTCTGAGTATT
TCGCTGGAGAACAGTGTGCATCTGCACACTCTTATGTGAGTGAAGTCAACAGCCTGCACCCCTTCCCTGGTCTGAGTATT
TGGGTTCTGACTCTGCTATCACACACTACTGTACTGCATTCTCTCGCTCTCTTTTTTAAACATATTTTATTTGTTTGT
GTGTATGCACATGTGCCACATGTGTACAGATACTATGGAGGCCAGAGAGGCCATGGCCGTCCCTGGAGCTGGAGTTACA

GGCAGCGTGTGAGCTGCCTGGTGTGGGTGCTGGGAACCAACTTGAATCTAAGCAGGCACTTTTACTGCTGAGGCAAGC
TCTCAGTACCCCTTCTTCATTTCTCCGCCCTGGGTTCCATTGTATGGACACATGTAGCTAGAPATATCTTGCTTATCTAATTA
TGTACATTGTTTTGTGCTAASAGAGASTAATGCTCTATAGCCTGAGCTGGCCTCAACCTTGCCATCCTCCTGCCCTCAGCC
TCCTCCTCCTGAGTGTAGGATGACAGGGGAGTGGTAACCTTACATGGTTTCATGTTTTGTTCAGACTGAAGGATACCAT
TCATACAGAGAAGGTCTGGSTCACAAGTGTGCAGTTCACTGAAAGGCAACCCGATGATCAAGAAACAACACTCAGGGG
CTGGAGAGATGGCACTGACTGCTCTCCAGAGGTCCGGAGTTCATTTCCAGCAACCCACATGGTGGCTCACAGCCATCTA
TAAGGAGATCTGACGCCCTCTTCTGGTGTGCTGAAGCAGGCTACAGTGTACTGACATAAATATAAATAAATCTTTAAAGC
ACACACACACACACAAATTACACCCAGABAGCCCACTCCATGTTCCCTCCAGGTCCTGCTGCTACAGTACTCCAGGTT
ACCCTCTCAGGCTTCTAACAACCTGGTTTACTTGGGCTCTTTTCTGCTCTGTGGAGCCACACATTTGTGTGGCTCAT
ACAGTCTCTTCTAGTATGTTGCATATTACTCTGGSTTTTACATGTATTTATTTATTTAGTTGTGTGTGGTGTGGG
CCATGCATGGCAGTGTGTGGGATGTCAGATATTGTGAACAGGGGACGTTCTTTTCTCAATCATGTGGGTTCCAG
AGGTTGAACCTCAGSTCATCATGTGTGGCAGCAAAATGCCTTTACCCACTGAGACATCTCCATATTCTTTTTTTTTCCCTG
AGGTTGGGGCTTGTTCATAGCCCAACTGGCTTGCACCTGCASTTCAAAGTGACTCCCTGTCTCCACTCTTAGAGTA
TTGGATTAGGATGTGTACTACCACACTGACTGGATCATTAAATGTTTTGATGGGGGCGGGGAGCCACATGCTGCAGG
TGAAGGGATGACTGGACTGGACATGAGCGTGGAAAGCCAGGAAACAGCTTCAGTCTAATGCTCTCCCAACTSAGCTATTC
GGTTTTGCCAGAGAACAACCTTACAGAAAGTCTCAGTGGCCTGTGGATTGGGGTTGGAGTTCBACTCATCAGCTTGACAT
TGGCTCCTTACCCACTGAGCCTTCTCACTACTCTCTACCTAGATCAATTAATCTTTTTTAAABAGACTTATTAGGGGGC
TGGAGAGATGGCTCAGCCGTTAAGAGCACCGAATGCCTTCCAGAGGTCCTGAGTTCATTTCCAGCATGCCATTGCTGG
GCAGTAGGGGGGCGAGGTGTCAACGTGAGTAGCTGTTGCCAGTTTTCCGGGGTGGAGAACCTCTTGACACCCTGCTGT
CCTGGTCACTTCTGGTGGTGCATGGTGAATGCTTGTGTATGGAGACTTTGACTGTTACAGTGAATTTGGGCTTCCA
CAGTTACCAGTCTCCCTGTTTTCTTGCAGGCCGGGTGCTTGTCCATTGCCGGAGGGCTACAGCCGCTCCCAACGCTA
GTTATGCCCTACCTCATGATGCGGCAGAAGATGGACGTCAAGTCTGCTCTGAGTACTGTGAGGCAGAATCSTGAGATCGG
CCCCAACGATGGCTTCTGGCCCAACTCTGCCAGCTCAATGACAGACTAGCCAAGGAGGGCAAGGTGAACCTTAGGGTG
CCCACAGCCTCTTTTCCAGAGGTCTGACTGGAGGGCCCTGGCAGCCATGTTTAGGAAACACAGTATACCCACTCCCTGC
ACCACCAGACACGTGCCACACTCTGTCCACTCTGGTCTCGGGGCCACTCCACCCTTAGGGAGCACATGAAGAAGCTC
CCTAAGAAATCTGCTCCTTAGCCATCCTTCTCTGAATTTATGCTCTCCCTGAGGTGAGGTTACAGTTTATGTCCCTG
TCTGTGGCATAGATACATCTCAGTGAACAGGGTGGGAGGGCTATCAGGGTGCATGGCCGGGACACGGGCACTCTTCAT
GACCCCTCCCCACCTGGGTCTTCTCTGTGTGGTCCAGAACCAGAGCCTGGTAAAGGAACTATGCAAACACAGGCCCTG
ACCTCCCATGTCTGTTCTCTGCTCAAGCCGACACGCCCTGCTGAGGCAGACGATGACATTAAGTTCTGAAGCAG
AGTGGAGATAGATTAGTACTAGATTTCCAAAAGGAGGAAAAGGCTGCATTTTAAATTAATTTCTTAGAATTA
AGATACTACATAGGGGCCCTTGGTAAGCAAATCCATTTTTCCAGAGGCTATCTGATTTCTTGGAAATGTTTAAAGTGT
GCCTTGCCAGAGCTTACATCTATATCTGCTGCTCAGAGCCTCCCTGAGGATGGCTCTGTTCTTTGCTTGTTAGA
AGAGCGATGCCCTGGGCAGGGTTCCCCCTTTTCCAGAAACAGGGTGAAGTCCAGCTATTACAACAACAACAACA
CAAACAACAAGGACCTCCATTTGGAGAATTGCAAGGATTTTATCCTGAATTAATAGTGTGGTGGTCAAGTCAAC
GCCAAGTGTGGCATCCTGCTTCTAAGAATAATTAGGAGGAGGACCTAGCCAATTGCAGCTCATGTCCGTGG
GTGTGTGCACGGGTGCATATGTTGGAAGGGTGCCTGTCCCTTGGGACAGAAAGAAAATGAAAGGCCCTCTGCTCAC

CCTGGCCATTTAAGGGAGGCTCTGCTGGTTCCACGGTGTCTGTGCAGGATCCTGAAACTGACTCGCTGGACAGAAACGAG
 ACTTGGGGGCACCATGAGAATGGAGAGAGAGAGCAAGAAAGAAACAGCCTTTAAAAGAACTTTCTAAGGGTGGTTTT
 TGAACCTCGCTGGACCTTGTATGTGTGCACATTTGCCAGAGATTGLACATAATCCTCTTGGGACTTCACGTTCTCATTAT
 TTGTATGTCTCCGGGTACGCGAGAGCCGTACGCCACCACCCAGCACCCGGCACATAGGCGTCTCTAAAAGCCCATT
 TATGAGAACCGAGAGCTGTTGAGTACCCCGTGTATAGAGAGAGTTGTTGTGTGGGGCACCCGGATCCAGCAGCCTGGT
 TGCCCTGCCTGTAGGATGTCTTACAGGAGTTGCAGAGAACTCCTTGGAGGGAAAGAAATATCAGGGATTTTTGTGA
 ATATTTCAATTCAGCTTTAAGTGTAGACTCAGCASTGTTGATGGTTAAGGTAAAGAACATGCCTTTTCCAGAGCTGCT
 GCAAGAGGAGAGGAGAAGCAGACCTGTCTTAGGATGTCTACTCCAGGGTAAGACCTCTGATCACAGCAGGAGCAGAGCTG
 TGCAGCCTGGATGTTTATGTTCCCTATTCTGTGTGACCAAGCAAGCCTGGTCAATAGGGCTGGTCACTTTTTTTTT
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAGAAATGAAGTGACCATAGCCAASTTGTGTACCTCAGTCTTTAGTTTCCAGGGCT
 CTCTTGCTCAATACATGTGCATTTCAAAATAACACTGTAGAGTTGACAGAACTGGTTCATGTGTTATGAGAGAGGAAA
 GAGAGGAAAGAACTAAACAAACAAACACCAACCAACCAACCAATCTGGGCTAGCCAGGCATGATTGCAATGTCTACAG
 GCCAGTTCATGAGAGGAGAGACAGGAAGACCGCCGAAAGGTCAAGGATAGCATGGTCTACGTATCGAGACTCCAGCCA
 GGGCTACGGTCCCAAGTCCTAGSTTTTGGATTTTGGGCTTGGTTTTTGGAGACAGGTTTTCTGTGTAGCCCTGGCTG
 TCCTGGAACTCGCTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCAAACTTAGAGATCTGCCTGACTCTGCCTTTGAGGGCTGGGACGAAT
 GCCACCCTGCCAACTAAGATTCCATTAAGAAAGAAAGTTCCAGATAATTAAGAGTTGCCAGCTCGTTAAAGCTAA
 GTAGAGCACTCTCAGGCTCTGCTTGGGCTGTTCTTGGCTTGGACCTGAAATCTGCCCAACAGTGTCCAAAGTGCA
 CATGACTTTGAGCCATCTCCAGAGAAGGAAGTAAAATTGTGGCTCCCAAGTCGATTGGGACACAGTCTCTCTTTGTCTA
 GGTAAACATAGGTGACACATAGCATTGAACCTCTCAGGGTGGTTCCCTCCCCCTGCCTCTTCTGGSTGGTC
 ACCCCATAGGACAGCCACAGGACAGTCACTAGCACCTACTGGAACTCTTTGTGGGACATGAAGAAAGAGCCTTTGGG
 AGATTCTGGCTTTCCATTAGGGCTGAAGTACAACGGTCTTGGSTGGCTTTGCCTCGTGTATAAAGACTAGCTACTA
 TTCTTCAGGTAAAATACCGATGTTGTGGAAAGCCAACCCCGTGGCTGCCCGTAGTAGGGGGTGGGTTGGGAATCCTG
 GATAGTGTCTATCCATGAAAGTGGTGGAAATAGGAATTAAGGTTTCCCCCCCCCCCCAACCTCTTCTCAGACCAG
 CCACCTTCTATGACTTATAAACATCCAGGTAAAATTACAAACATAAAAATGGTTTCTTCTCAATCTTCTAAAGTCTG
 CCTGCCTTTCCAGGGGTAGGTCTGTTCTTTGTGTCTTATTGTCTTGGAGCAGCAGACTAACACTTACCAATAGAGGG
 AACTCTTGGCCATACTAAGGCTCTTCTGGGCTCCAGCACTTTAAGTTATTTAAGAAATTCACCTTGGCCTTTAGCAC
 ACCCGCCACCCCAAGTGGGTGTGGATAATGCCATGGCCAGCAGGGGGCACTGTTGAGGCGGGTGCCTTTCCACCTAAG
 TTGCTTATAGTATTTAAGATGCTAAATGTTTTAATCAAGAGAGCACTGATCTTATAATACGAGGATTAAGAGATTTTCTC
 ACAGGAAATGTCTTTTTCATAATTCTTTACAGGCTTTGTCTGATCGTAGCATAGAGAGAATAGCTGGATATTTAAT
 TGTATTCATTTTCTCTGCCAGCGTTAGGTTAACTCCGTAAAGTGAATTCAGTGGACCGAAGAGGCTCAGAGGGCAGG
 GGATGGTGGGGTGGGAGAGCACTGTCACTGCCAGGCATGGGAGGTCCTGCCATCCGGGAGGAAAAGGAAAGTTTAGC
 CTCTAGTCTACCACAGTGTAAAGCACTCTAAAGTTGTAACCAAAATAAATGTCTTACATTACAAAGACGTCTGTTTTG
 TGTTCCTTTGTGTGTTTGGGCTTTTATGTGTGCTTTATAACTGCTGTGGTGGTGTGTTAGTTTTGAGGTAGGA
 TCTCAGGCTGGCCTTGAACCTCTGATCGCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGTCCCTGCCCTCAAGTGTCTAGGACT
 AAAAGCACATGCCACCACACAGTACAGCATTTTCTAACATTTAAATAATCACCTAGGGGCTGGAGAGAGGGTTCCA
 GCTAAGAGTGCACACTGCTCTTGGGTAGGACCTGAGTTTGTCCAGAACCTATACTGGGTGGCTCCAGGTCCAGAGGA

TCCAGGACCTCTGGCCTCCATGGBCATCTGCTCTTAGBCACATACCCACCTACAGATACACACATAAABATAAATGAAGC
CTTTAAAACCTCCTAAAACCTAGCCTTGGAGGTACCACTCTGGAAAGCTGGCATACTGTGTAAGTCCATCTCATGCTG
TTCTGGCTAACGTAAGACTTACAGAGACAGAAAGAACTCAGGGTGTGCTGGGGTTGGGATGGAGGAAGAGGGATGAGT
AGGGGGAGCACGGGAACTTGGGCAATGAAATCTTTACAGGACACTAGAGGAGGATAAATACCAGTCATTGCACCCAC
TACTGGCACTCCAGGAATTAATGCTGGGTGAAABAAAGGCCCCAGGTATTGGCTGCATTGGCTGCATTTGCGTAC
ATTTTTTAAATTGAAAAGAAAABATGTAAATCAAGCTTAGATGAGTGGTTGCTGTGAGCTGAGAGCTGGGGTGAAGTGA
GACATGTGGACACTCCATCAAAAACGACAGAAAGAAAGGGCTGTGGTGACAGCTACCTCTAATCTCCACTCCGGGAG
GTGATCAGGGTTAGCCCTCAGCTAAGCTGTGGTGCATGAGACCTGTTTCAAAAACCTTTAATAAGAAATATGAAABAA
GACATCAGGGCAGATCCTTGGGGCCAAAGGGCCAGACAGCCAGCTCTGCTGCTAAGGTCGTGTAGAAGCGGATGCATGAGCA
CCTGCCGAGGCATCATGAGAGAGCCCTAGGTAAAGTAAAGATGGATGTGAGTGTGCTGGCGTGGGCGACTGCAGCTCCT
GGCTGTGGTGTGACTGGACTGGCATCTTGGTGAGCTGTGAAAGGAAATGGGTAGGGAGATCATAAAATCCCTCCGAATTAT
TTCAAGAACTGTCTATTACAATTAATCAAAATATTTAAAAAAGAGAAATTAALAAACAABAAACCTATCCAGGTGTG
GTGGTGTGCACCTATAGCCACGGCCACTTGGAAAGCTGAGGACAGAGGATGGCGAGTTTGAAGGTATCTGGGGCTGTACA
GCAAGACCGTCTCCCAAAACCAAAACAAAGAGCAAAACCAATTATGTACACAGAGAGTGTATAGTGAGCGGCCTCGCT
GAGAGCATGGGTGGGGTGGGGTGGGGACAGAAATATCTAACTGCAGTCAATAGGGATCCACTGAGACCTGGGGC
TTGACTGCAGCTTAACCTTGGGAAATGATAAGGGTTTTTGTGTGAGTAAAAGCATCGATTACTGACTTAACCTCAAATGA
AGAAAAGAAAAGAAACAAACAAAGCCAAACCAAGGGGCTGGTGAATGGCTCAGTGGGTAAAGACACCCGACTGC
TCTCCGAAGGTCCAGAGTTCAAACTCCAGCAACCACATGGTGGCTCAACAACCATCTGTAAAGAGATATGATGCCCTCTT
CTGGTGTGTCTGAAGACAGCTACAGTGTACTTACATATATAAATAAATCTTAAAAAABAAAAAABAAAGCCAAA
CCGAGCAAAACAGGCCCCCAACAAAGGACAGGACGAGGACGACAGGACATCCTGTGAAGGCAAGGGCTACC
CATGGGCCGAGGAGGGTCCAGAGAAATAGGCTGGTAAAGCTCAGTTTCTCTGTATACCCTTTTCTTGTGACACTACTTC
AATTACAGATAAATAACAATAAACAATCTAGAGCCTGGCCACTCTCTGCTCGCTGATTTTTCTGTTACGTCACAG
CAGGTGGCGAAGTGTCCAAAGGACAGATCGCATCATTAAGTGGCCAGCATAATCTCCATCAGCAGGTGGTGTGTA
GAACCAATTATGGTGTCTACAGAAATCCCGGCCCAAGGAGCTGCCCTCTCCCAAGTCTGGAGCAATAGGAAAGCTTTCTGGC
CCAGACAGGGTTAACAGTCCACATTCAGAGCAGGGGAAAGGAGACTGGAGGTACAGACAAAGGGCCAGCTTCTAAC
AATTCACAGCTCTGGTAGGAGAGATAGATCACCCCAACAATGGCCACAGCTGGTTTTGTCTGCCCGAAGGAAACTGA
CTTAGGAAGCAGGTATCAGAGTCCCTTCCAGGGGACTTCTGTCTGCCCTGTAAAGCTGTGAGAGCAGCTGCATTGAT
GTGTGGGTGACGAAGATGAAAAGGAGGCCAGGACAGATGGCCACAGATGGACCGGCCACTTACAAGTCGAGGCAGGTG
GCAGAGCCTTGCAAGGCTCTGCAGGTGGACGACACTGATTCATTACCCAGTTAGCATACCACAGCGGGCTAGGCGGACC
ACAGCCTCCTTCCAGTCTTCTCCAGGGCTGGGAGTCTCCAACTTCTGTCTCAGTGCAGCTTCCGCCAGCCCTCC
TCCTTTTGCACCTGAGGTGTGAACCTCCCTCCTCTCCTTCTCCCTGTGGCATGGCCCTCCTGCTACTGCAGGCTGAGCA
TTGGATTTCTTTGTGCTTAGATAGCCTGAGATGGCTTTCTGATTTATATATATATATCCATCCCTTGGATCTTACATCT
AGGACCCAGAGCTTTTGTGATACCATAGAGGCTGGGAGATGATATGGTAAAGAGTGTGCTGTACAAGCATGAAGAC
ATGAGTTGAAATCCCAAGCAACCATGTGAAAATAACCTTCTAACCTCAGAGTTGAGGGGAAAGGCAGGTGGATTCTGG
GGCTTACTGGCCAGCTAGCCAGCCTAACCTAAATGTCTCAGTCAAGATCCTGTCTCAGGGAATAACTTGGGAGAAATGA
CTGAGAAAGACACCTCCTCAGGTCTCCATGCACCCACAAGACACACGGGGGGGGTAAATGTAATAAGCTAAGAAATA

ATGAGGGGAATGATTTTTTGGCTAAGAAATGAAATTCCTGTGTGGCCGCAAGAGSCCTGGCCAGGGAAGGAAGTGCCTTTG
GCACACCAGCCTATAAGTCACCATGAGTTCCTGGCTAAGAAATCACATGTAATGGAGCCAGGTCCCTCTTGCCTGGTGG
TTGCCTCTCCACTGCTTTTGAAGAGAAATTCAGAGAAATCTCCTTGGTCAGAAATGTAGGTCTGAGCAATGTGGAGC
TGGGGTCAATGGGATTCCTTTAAAGGCATCCTTCCCAGGGCTGGSTCACTTCAATAGTAGGGTGTTCACAGCAAGC
GTGAGACCCTAGGTTAGAGTCCCCAGAAATCTGCCCCACCCCCCAAAAGGCATCCTTCTGCCTCTGGGTGGSTGGGG
GAGCAAAACACCTTAACTAAGACCATTAGCTGGCAGGGSTAACAAATGACCTTGGCTAGAGAAATTTGGTCAAGCTGGAT
TCGGCTTCTGTAGAGCCCACTTSTTTCTTTGTTAAGCTGGCCACAGTTTSTTTTGAAGATGCTGAGGGGCCAG
GGAGCCAGCAATTAAGAGCCAGGCTCATTTTGATATCTGAAGACACAGCCTGACTGCCTTCCCGTGGGAGGTACTGG
GAGAGCTGCTGTGTCCCTGCCTCACCAACGCCCCGCCCCACACACACTCCTCGGGTCACTGGGAGGTGCCAGCAG
CAATTTGGAAGTTTACTGAGCTTGAGAACTCTGGGAGGGCTGACGCTAAGCACACCCTTCTCCACCCCCCCCCACCCC
ACCCCGCTGAGGAGGAGGCTGAGGAACATGGGACCAACCCCTGCTCCAGCCCGTCTTATTGCTGGCATGAGGCAGAGG
GGGTTTAAAGAGCAACCGTATCTAGGCTGGACACTGGAGCCTGTACTACGGAGTGCCTCTCCACCTGGCAGCATGC
AGCCTTACTAGCCCGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCAGCTGCCTTCTGTGCTGTGAGGGCCAGGGGTGGCAAGCC
TTGAGAAATATGCCACAGAGGTCACTCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAAACAGCAGACCATGAA
CTGGAGAGAAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACCCCAAGGTAGGGGATGAAAGAGCACATTAGTGGGG
GAGAAATCTGAGAGGTGACTGGGGTGGTTTTAGCATCTTCTCAGAGGTTTGTGTGGGTGGCTAGCCTCTGCTACATCA
GAGAGAGAGCAATTTGCCTGGAAGAATACTAGCACAGCATTAGAACCCTGGAGGGCCAGCATTGGGGGCTGCTAGAGAGC
AGAAAGAGAGGTTGGAGGCTGAGGTCAGCCGAGGCTGGCATTAAACCGGGCATGGGCTTGTGTGATGGTCCAGAGAACT
TCTTCTAAGAAATGAGGACACAGGTCAGATCTAGCTGCTGACCAGTGGGGAGTGATATGCTGAGGCTGGATGCCAGATG
GCATGCTGCTGCTACTATATCCACATGACCACCACATGAGGTAAGAGAGGCCCCAGCTTGAGATGGAGAAACCGAGA
GCTCCTGAGGTAAGTCACTGGGAGTAAGAGAGSCTGAGACTGGAAGCTGGTTTGTATCCAGATGCAAGGCCAACCTAG
ATTGGCTTTGCTGGAAACCTGAAGCCAGGAGGAATCCCTTTAGTTCCCCCTTGCCAGGGTCTGCTCAATGAGCCAGA
GGTTAGCACTTAAAGAACAGGGSTTGTAGGTGGCATGTGACATGAGGGGCAGCTGAGTGAATGTCCCTGTATGAGCA
GAGGTGCACTACTTGCCTGAGCTTGCACCCTGACCCCGCTTTGCCTCATCCTGAGGACAGCAGAACTGTGGAGGC
AGAGCCAGCAGAGAGATGCCTGGGGTGGGGTGGGGTATCACGCACGGAAGTACAGCAATGAATGGGGTGGGGTGG
CAGCTGAGAGGACACTCCAGAGAAATGACCTTGTGGTCAACCTTTGTGTGGGAGGAGGCTCATTTCAGCTTGCAC
CACATGCTGCTGCTCCTAGCCAGTAAAGGATGTGGAGGAAAGGGCCACCCCAAGGAGCATGCAATGCAGTCA
GTTTTTTCAGAGGAGTGTCTGACCTAAGGGCACTATTCTTGGAAAGCCCCAAACTAGTCTTCCCTGGGCAACAGG
GCTCCCGCACATACCACCTCTGCAGGGGTGAGTAAATTAAGCCAGCCACAGAGGGTGGCAAGGCCTACACCTCCCCCT
GTTGTGCCCCCCCCCCCCCGTGAAGGTGCATCCTGGCCTCTGCCCTTGGCTTGGTACTGGGATTTTTTTTTTCTT
TTATGTCATATTGATCCTGACACCATGGAACCTTTGGAGGTAGACAGGACCCACACATGGATTAGTTAAAGCCTCCCAT
CCATCTAAGCTCATGGTAGGAGATAGAGCATGTCCAAAGAGAGGAGGGCAGGCATCAGACCTAGAAGATATGGCTGGGCAT
CCAACCCATCTCCTTCCCCGGAGAAACAGACTCTAAGTCAATCCAGCCACCCCTTGAGTAACCAGCTCAAGGTACACAGA
ACLAGAGAGTCTGGTATACAGCAGGTGCTAAACAAATGCTTGTGGTAGCAAAAGCTATAGGTTTTGGGTGAGAAGTCCGA
CCCAAGTCGGGAGTGAAGAGCGAAAGGCCCTTACTCGCCACCGCCCCCGCCCCACCTGGGGTCTATAACAGATCACTT
TCACCTTGGGGAGCCAGAGAGCCCTGGCATCCTAGGTAGCCCCCCCCCCCCCCCCGCAAGCAGCCAGCCCTGCC

ES 2 272 093 T5

TTTGGGGCAGTTTCTTTTCTCAGCCTGGACCTGTGATAATGAGGGGGTTGGACCGCCGCCCTTTGGTCGCTTTCAAGTCT
AATGATTCTTATCCCTACCACCTCCCTTCTACCCCGCTCCTCCACAGCAGCTGTCTGATTTATTACU TTC AATTAA
CTCCACTCCTTTCTCCATCTCCTGGGATACCGCCCTGTCCAGTGGCTGGTAAGGAGCTTAGGAAAGGACCAGAGCCAG
GTGTGGCTAGAGGCTACCAGGACGGCTGGGGATGAGGAGCTAAACTGGAGAGTGTTTGGTTAGTAGGCACAAAGCCTT
GGTGGGATCCCTASTACGGAGAGTGGAGATGGGGCTGAGAGTTCAAGACCATCCATCCTTAACTACACAGCCAGT
TTGAGGCCAGCCTGGGCTACATAAAAACCCAACTCTCALAAGCTGCCAATTCTGATTCTGTGCCACGTAGTGCCCGATGTA
ATASTGGATGAAGTGTGAATCCTGGGGCAACCTATTTTACAGATGTGGGAAAGCAACTTTAAGTACCCCTGCCGAGA
GATGACAAAGAAAGTAAAGTACAGAGAGCTCCAGTGTTCATCCCTGGGTTCCAAAGGACAGGGAGAGAGAGCCAGGGTGGG
ATCTCACTGCTCCCGGTGCTCCTTCCATAATCCATACAGATTGGAAAGCCAGGGCAGGTTTGGAAAGAGAGAGAG
GGTGGAGAGGAGCAGCCAGTCTGGCTAGGCTGCAGCCCTCACGCATCCCTCTCTCCGCAGATGTGTCCGAGTACAGCT
GGCGGAGCTGCCTACACCCGCTTCTGACAGAGCGGCCATGCCGACGCGCCAGCCGGTCAACCGAGTTGGTGTCTCC
GGCAGTGGGCCCCGGGGCTGCTGCCAACGCCATCGGGCGGGTGAAGTGGTGGCGCCGAAACGGACCGGATTTCCG
CTGATCCCGATCCCTACCGCGCGAGCGGGTGCAGTGGCTGTGCCCGGGGGCGGGGGCGCGCTCGCGCAAGGTGC
GTCTGGTGGCTCTGCAAGTGCAGCGCTCACCCGCTTCCACAACCGTGGAGCTCAAGGACTTCCGGCCGGAGGAC
GGGGGGCGCAGAAAGGCTCCGAAAGCGCGGCCCGGGCGCCGGGAGCCAAAGCCACCCAGCGGAGCTGGAGAACCCCTA
CTAGAGCGAGCCCGCCCTATGCAGCCCGCGGATCCGATTCGTTTTCAAGTGAAGCCCTGCAGCCAGGCCAGGGGT
GCCAACTTTCCAGACCGTGTGGAGTCCAGCCAGTAGAGACCGCAGGTCTTCTGCCCGCTGCGGCGGATGGGGAGG
GGTGGGGTTCCCGGGCCAGGAGAGGAGCTTGAGTCCAGACTCTGCCTAGCCCGGGTGGGATGGGGTCTTTCTA
CCCTCGCCGGACCTATACAGGACAGGCAGTGTTCACCTTAAAGGGAAAGGAGTGTGGAACGAAAGACCTGGGACTGG
TTATGGACGTACAGTAAAGTCTACTCCTTCCACCCAAATGTAAGCCCTGCGTGGGCTAGATAGGGTTTCTGACCTGACC
TGGCCACTGAGTGTGATGTGGGCTACGTGGTCTCTTTTGGTACGGTCTTCTTGTAAATAGGGACCCGAACTCTGCT
GAGATTCCAAAGGATTGGGGTACCCCGTGTAGACTGGTGAAGAGAGAGGAGAACAGGGGAGGGTTAGGGGAGAGATTGTGG
TGGCAACCGCCTAGAAAGAGCTGTTGTTGGCTCCAGCCTCGCCGCTCAGAGGTTTGGCTTCCCCACTCCTTCCCTC
TCAAATCTGCCCTTCAATCCATATCTGGGATAGGAAAGGCCAGGGTCCGAGAGATGGTGAAGGGCCAGAAATCACACTC
CTGCCCCCGAAGAGCAGTGTCCCGCCCCAACTGCCTTGTCAATTTGTAAGGGATTTTCTACACAACAGTTTAAAGT
CCTTGGAGAAACTGGCTTGCAGTCACTCCCATCCTTGTCCCTTGCCAGGACACCACCTCCTGCCTGCCACCCAGG
ACACATTTCTGTCTAGAAACAGAGCGTCTGCTGCTGTCTCTGAGACAGCATATCTTACATTAAGAAATAATACGGG
GGGGGGGGGGGAGGGCGCAAGTGTATACATATGCTAGAAAGCTGTGAGGGCCACAGCACCCACCAATCTTTTGT
AAATCATTTCCAGACACCTCTACTTTCTGTGTAGATTTTAAATGTTAAAGGGGAGGAGAGAGCGTTTGTAAACAGAA
GCACATGGAGGGGGGGTAGGGGGTTGGGGCTGGTGAAGTTTGGCGAAGTTTCCATGTGAGACTCATCCACAAGACTGA
AAGCCGCTTTTTTTTTTAAAGAGTTCAGTGACATATTTATTTTCTCATTTAAGTTATTTATGCCAACATTTTTTCTTG
TAGAGAAAGGCAGTGTAAATATCGCTTGTGAAGCAAGTGTGTGGTTTTTGTTTTTTGTTTTTTCCCGACCCAGA
GGCATTGTTAATAAAGACAATGAATCTCGAGCAGGAGGCTGTGGTCTGTTTTGTCAACCACACACAATGTCTGCCACT
GTCACTCACTCCCTTCCCTTGGTCAAGACCCAAACCTTGACAACACCTCCGACTGCTCTCTGGTAGCCCTTGTGGCA
ATACGTGTTCTTTGAAAAGTCAACATTCCTTTCTTTGCAAACCTGGCTCTCATTCCCAGCTGGGTATCGTCAT
ACCCTCACCCAGCCTCCCTTAGCTGACCCTCTCCACTGTCTTCCAAAAGTGCACGTTTCCACCGAGCCAGTTCCT

ES 2 272 093 T5

GGTCCAGTGCATCCCAATTGCTCCTTGGTCCAGACCCCTTCTCCACCAAGATGTTCTCTCCACTCCATCAAGCCCC
AGTGGCCCTGCGGCTATCCCTGTCTCTTCAGTTAGCTGAACTACTTGTGTACACCACATGAATTCCTTCCCTGTCTTA
AGGTTTCATGGAACCTTTCGCTGCCCTGAACCTTCCAGGACTGTCCACGGCTGTGATGTGTCTCTCTTGTAAAGCCC
CACCCCACTATTTGATTCCCAATTCATAGATCTTCCCTTGTTCCTTCCACGGGATAGTGTCTCATCTGGCCAACTCCT
GCTTGATATTGGGATAAATGCAAAGCCAAAGTACAAATTGAGGACCAAGTTCATCATTGGGCCAAGCTTTTTCAAAATGTGAA
TTTTACACCTATAGAAGTGAATAAGCCCTTCCAAAGCAGAGGCCAATGCCCTGGCTCTTCCCTCAACATCAGGGCTCCTGCTT
TATGGGTCTGGTGGGCTAGTACATTCATAPACCCAACTAGGGGTGTGAAAGCAAGATGATTGGGAATTGAGGGCCAT
CTTGGCTATGAGGCCCTGTCTCAACCTCTCCTCCCTCCCTCCAGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTGTATTTGAAACTG
CAACACTTTAATCCAGTCAAGTGCATCTTTGGGTGAGGGGACTCTATCCCTAATATBAGCTTCCATCTTGATTTGTGT
ATGTGCACACTGGGGGTTGAACTGGGCCCTTTGTACCTGCCGGGCAAGCTCTCTACTGCTCTAACCACAGCCCTCACTGG
CTTTCTGTTTCAACTCCCAATGAATCCCTAAATGAATTATCAATATCATGTCTTTGAAAAATACCATTGATGCTGCT
GGTGTCCCTGTGGTTCCAGATTCAGGAAAGGACTTTTCAGGAAATCCAGGCATCCTGAAAGATGTCTTAGAGCAGGAGGC
CATGGAGACCTTGGCCAGCCCCACAAGGCAGTGTGGTGCAGAGGTGAGGATGGAGGCCAGGCTTGCAATTGAAGCTGAGA
CAGGGTACTCAGGATTAATAAGCTTCCCCCAAAACAAATCCAAAGATCAGTTCCCTGGTACTTGCACCTGTTAGCTATGCA
GAGCCCACTGGGCATAGGTGAAGACACCGGTTGTACTGTCTGTACTAAGTGTCTTACAGAGCCGGCAGAGACAAATAAT
GTTATGGTACCCCAAGGGACAGTGTATCCAGAAGGACACAGAGAGAGAGTGTCTAGAGGCTGCCCTGAAGGAGAGGG
GTCCCAAGCTCTCTAAGCAAGACTCCACTCACATAAAGACACAGGCTGAGCAGAGCTGGCCGTGGATGACAGGGAGCCCA
TCCACCATCCTTTAGCATGCCCTTGTATTCCCATCACATGCCAGGATGAGGGGCATCAGAGAGTCCAAGTGATGCCCAA
ACCCAACACACCTAGGACTTGCTTCTGGGACAGACAGATGCAGGAGAGACTAGGTTGGGCTGTGATCCCATACCACA
AAGAGGGAAATAACAAAAACA
GGTCAAGTTAGAGTTTATTTATGGAAAGTTATATTCTACCTCCATGGGGTCTACAAGGCTGGCGCCCATCAGAAAGAACA
AACAAAGGCTGATCTGGGAGGGTGGTACTCTATGGCAGGGAGCAGTGTGCTTGGGGTACAGCCAGACACGGGGCTTG
TATTAATCACAGGGCTTGTATTAATAGGCTGAGAGTCAAGCAGACAGAGAGACAGAGGAAACACACACACACACACACA
CACACACACACACACACACATGCACACACCACTCACTTCTCACTCGAAGAGCCCTACTTACATTCTAAGAACAAACC
ATTCTCCTCATAAAGGAGACAAAGTTGCAGAAACCCAAAGAGCCACAGGGTCCCACTCTCTTTGAAATGACTTGGAC
TTGTTGCAGGGAAGACAGAGGGTCTGCAGAGGCTTCTGGGTGACCCAGAGCCACAGACACTGAATCTGGTGTGAGA
CCTGTATAAACCTCTTCCACAGGTTCCCTGAAAGGAGCCACATTCACCAACCCTGTCTCCTGACCACTGAGGATGAGA
GCCTTGGGCCCTTCCCACTTCTGGAGTGCACCTGGTTTCCCACTCTGAGGGCAGATGAGGCTCAGGCTTGGGAAAG
TTCCACAAAGTATTGAAAGTGTCTTGTGTTTGTGATTTAATTTAGGTGTATGAGTGTCTTTGCTTGAATATATGCTT
GTGTAGCATTTACAAGCCTGGTGCCTGAGGAGATCAGAAGATGGCATCAGATACCCCTGGAACCTGGACTTGCAGACAGTTA
TGAGCCACTGTGTGGGTCTAGGAACGAACTGGATCCTCCGGAAGAGCAGACAGCCAGCGCTCTTAGCCACTAAGCCA
TCACTGAGGTTCTTTCTGTGGCTAAAGAGACAGGAGACAAAGGAGAGTTTCTTTTAGTCAATAGGACCATGAATGTCTCT
CGTAACGTGAGACTAGGGCAGGGTGAATCCCCAGTGACCCGATGGCCCTGTGTAGTTATTAGCAGCTCTAGTCTTATTC
CTTAATAAGTCCAGTTTGGGCAAGGAGATATGTATCCCTGCTTTGAAAGTGGCTGAGGTCAGTTATCTACTTCCAAGT
ACTTGTCTCTTTCTGGAGTTGGGAAAGCTCCCTGCCTGCCTGTAATGTGTCCATTCTTCAACCTTAGACAAGATCAC
TTTCCCTGAGCAGTCAAGCCAGTCCAAAGCCCTTCAATTTAGCTTTCATAGGAACCCCTTTTGTGGGTGGAGGTAG

GACAGGTGGAGCCCTGGAGTTTGAATTCAGGTTCTGTGGAAACTCTCTCTRAAAGACARTATGGTGAGTACCCCGG
AGGATATCTGATATTGACTTCTGGCCACACACAGCCATCTCTGCACATCTGTAGTTGCAAGCCCTTTTGCCTAAGTTT
GCCAGAGTCAGAGTTTGCAGTGTTTGTGGACTGATSCACGTGTTGCTGGTATCTACAAAGTCACCCCTCCTTCTCAA
CTAGCAGCACTGGCTTCGGCCAGCTGCTCATTCAAAGCCTCTTTGCAGAGTCATCACGGGGATGGGGGAGCAGGGCCCTC
CCTAGAACACCAAGCCTGTGGTTGTTTATTTCAGGACATTATTGAGGGGCBAGATGACAGATAACTCTATCACTTGGCCAA
CAGTCCGGTGTGGGGTGTAGGTTATTTCTGTGTCTSCAGAPAAAGASTGCRACCTGGACAAAAGAAATAAATGATATCA
TTTTTCATTACAGCCACTAGATTCCGTGTACAAAAGCCTCCCTGGGGAGCAGGGCCGGGACAGCGGGCTCCTGAGTGG
CTATTTCCCTCTGTCAACTTCTCTAATCTCTTGATTTCCTCCCTCTGTCTGTTTCTTCTCTCTGCTGGGGCCAGTGA
GTCTGTGTACTACAGGGAGGAGGGTGGCCAAAGCCCTGGTCTCTACGGGCTGGGGGAGGGGGGAAAGCTGTGGCCCA
TGACTTTTTCCCTTCTCTTTTTCTTAGAACCAGTCTCAATTTAAGTAAATGAGTCTCCTCATTCACTGTGCTCACT
ATTCATAGGGACTTATCCACCCCGCCCTGTCAATCTGGCTAAGTAAAGCAAGTCAATTTTAAAAGGGAACGTTTTTCTA
AAAATGTGGCTGGACCGTGTGCCGSCACGAAACCAAGATGGCGGTCTAAGTTACATGCTCTCTGCCAGCCCGGTGCC
TTTTCTTTCCGAAAGGAGACCCGAAAGTAAACGAAAGTGGCAACTTTTTATGATGGTGTGCCCGGGTGACTCTTTAA
ATGTCATCCATACCTGGGATAGGGAAAGGCTCTTCAGGGAGTCACTAGCCCTCCCTTCAGGAABAGATTCCACTTCGGT
TTAGTTAGCTTCCACCTGGTCCCTTATCCGCTGTCTGTGCCCACTAGTCTCTCATCCATCCGGTTTCCGCCCTCATCCAG
TTGCCCTTTTAGTTCTAGAAAGCAGCACCGTAGTCTTGGCAGGTGGGCCATTGGTCACTCCGCTACCCTGTTACCATG
GCCACCAAGGTGTCAATTAATATGAGCTCACTGAGTCTCTGCCGGATGGCTTGSTTGGTAAATATGCTTGCTGCAAAATCG
TGAGAACTGGAGTTCAATTCACAGCACTGGATGATTTCCAGCACTGGAAAGGCAAGGAGCAGAGATCTTAAAGCTCT
GGCCAGACAGCCAGCCTAATTAGTAAATCAGTGAAGACCCCTGTCTCAAGAAACAGATGGAAACATCAAAGGTCAACCTC
TTGTCTCCACACACAAATACACACATGCACATACATCCACACACAGGCAACACATGCACACACCTGAACACCCCTCCA
CAATACATACATAPAAAATAAATAACATACACACATACATACATACACCAACATCCCTCTCCTTAGTCTCCTGGCTAC
GCTCTTGTACCCCCACTAAGGCTTCACTTCTTCTATTCTTCTCATCTTGACTCCTCTGTACTTTGCATGCCTTTTCCAG
CAAAGGCTTTTTCTTAAATCTCCGTCATTCATAAACTCCCTCTAATTTCTTCCCCTGCCCTTTTCTTCTCTAGGGA
GATAAAGACACACACTACAAGTCAACCGTGGGACCAAGTTTATCACCCACCCACCCCTGCTTCTGTTATCCGGCCAGCT
AAGTAGTCCAACTCTCTGGTGTGTACCCCTGGACCCCTGGCTTACCACAGCTCCTCCATGCTACCCAGCCCTGCAAAAC
TTCAGCCTAGCCTCTGTTCTCCAACAGCACAGGCCAGTCTGGCTTCTATGTCTAGAAATCTCCTTCATTTCTCTCCA
TTTTCCCTCCTGAATCTACCACCTTCTTCTCCCTTCTCCTGACCTCTAATGTCTTGGTCAAACGATTACAAGGAAGCCAA
TGAAATTAGCAGTTTGGGGTACCTCAGAGTCAGCAGGGGAGCTGGGATGAATTCACATTTCCAGGCCTTTGCTTTGCTCC
CCGGATTCTGACAGGCAGTCCGAAAGCTGAGTCCAGGAAGCTGAATTTAAAATCACACTCCAGCTGGGTCTGAGGCAGC
CCTACCACATCAGCTGGCCCTGACTGAGCTGTGTCTGGTGGCAGTGGTCTGGTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
GTGGT
GACAAATCTGCCTCATATAGGCAGAAAGATGACTTATGCCTATATAAGATATAAAGATGACTTTATGCCACTTATTAGCA
ATAGTTACTGTCAAAGTAATTCTAATTTATACACCCCTTATACATGGTATTGCTTTTGTGGAGACTCTAATAATCCAGATT
ATGTATTTAAAAAAAATTTCCCAAGTCTTAAAAGTGAAGAATGGACCCAGATAGAAGGTACGGCACAAGTATGGAGT
CGGAGTGTGGAGTCTGCCAATGGTCTGGACAGAAAGCATCCAGAGAGGGTCCAAAGACAAATGCCTCCCTCCTAAGGAAC
ACTGGCAGCCCTGATGAGGTACCAGAGATTGCTAAGTGGAGGAATACAGGATCAAGCCATGGAGGGGCTTAAAGCGTGA

ES 2 272 093 T5

CTGTAGCAACCCCTCCGCTGAGGGGCTCCAGGTGGGGGCCCAAGGTGCTGCAGTGGGAGCCACATGAGAGGTGATGTCTTG
GAGTCACCTCGGGTACCATTGTTTAGGGAGGTGGGGATTGTGGTGTGGAGACAGGCAGCCTCAAGGATGCTTTTCAACA
ATGGTTGATGAGTTGGAACATAAACAGGGGCCATCACACTGGCTCCCATAGCTCTGGGCTTGGCAGCTTCCACATCTGCC
CCCCACCCCTGTCTGGCACCAGCTCAAGCTCTGTGATTCTACACATCCAAAAGAGGAAGAGTAGCCTACTGGGCATGCC
ACCTCTTCTGGACCATCAGGTGAGAGTGTGGCAAGCCCTAGGCTCCTGTCCAGGATGCAGGGCTGCCAGATAGGATGCTC
AGCTATCTCTGAGCTGGAACATATTTTAGGAATAAGGATTATGCCCGCCGGGGTTGGCCAGCACCCAGCAGCCTGTGC
TTGCGTAAAAACAAGTGTCTGTGATTTATCTAAAAACAGAGCCGTGGACCCACCCACAGGACAAGTATGTATGCATCTGT
TTCATGTATCTGAAAAGCGACACAACCATTTTTACATCATGGCATCTTCTAACCCTTCTTTTTTTGTTTTGTTTTT
TTGAGAGCAGGTTTTCTCTGTGTAGTCTGGCTGTCTGGAACTCACTTTGTAGACCAGGCTGGCCTCGAACTCAGAAATC
CTGGGATTAAGGTGTGTGCCACCAGCCCGGCCCTAACCCCTTCTTAATGGTGATCCAGTGGTTGAAATTTGGGGCC
ACACACATGTCCATTAGGGATTAGCTGCTGTCTTCTGASCTACCTGGTACAATCTTTATCCCTGGGGCCTGGGCTCCTG
ATCCTGACTCGGGCCCGATCAAGTCCAGTCTCTGGGCCCGATCAGTCCAGTTCTGGGCCCGAACAGTCCAGTCCCT
AGCTCGATTAGCTCATCCTGGCTCCCTGGCTGTCTTACTTACACTCTTCCCTTGCTCTGGACTTGTGTCTTTCTTTA
CTCAAGTTGTCTGCCACAGTCCCTAACCCACCTCTGTAAGACAACATAAGATAACTTCCCTCAAGCCGGAAAGTCTCTG
AGTCACCACACCCCTCTGGAGGTGTGTGGACACATGTTTCATGGCTGTGGTTGCGCTTACGTACGTGTGC

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

5

tagaggagaa gtctttgggg agggtttgct ctgagcacac ccctttccct cctccgggg 60
ctgagggaaa catgggacca gccctgcccc agcctgtcct cattggctgg catgaagcag 120
agaggggctt taaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa 180
ggtagcgtgc cctcctctgg ctggtacat gcagctccca ctggccctgt gtctcgtctg 240
cctgctggta cacacagcct tccgtgtagt ggagggccag gggtagcagg cgttcaagaa 300
tgatgccacg gaaatcatcc ccgagctcgg agagtacccc gagcctccac cggagctgga 360
gaacaacaag accatgaacc gggcggagaa cggagggcgg cctccccacc accccttga 420
gaccaaagg atggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggttttaga 480

ES 2 272 093 T5

aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagaccca gtgaagattg ctggcctctg 540

ccagcactgg tcgaggaaca gtcttgcttg gaggtggggg aagaatggct cgctggtgca 600

5 gccttcaaat tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tggtagagagc ccagggcagg 660

gaggacgctg gggtaggtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag 720

aaaagaaaag gtttcaaaga atctcctcct ggaatatag gagccacgtc cagctgctgg 780

10 taccactggg aagggaaaca ggtaagggag cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg 840

caccggacac tctatgctgg tggtaggtgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc 900

15 cccaggaggt gaacccccag ctggaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt 960

ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gttgatcca actgcaagat agccctggtg 1020

tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca 1080

20 cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccaggagct ggcacttgaa ggaatgggag 1140

ttttcggcac agtttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag 1200

25 agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccacc cagtcccaac 1260

cttgcctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaacctt .gggttcctgg tcaggcctgc 1320

acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcatct ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc 1380

30 atqqgggagt ctgaaatgac acttcagact aagagcttcc ctgtctctctg gccattatcc 1440

aggtggcaga gaagtccact gccaggctc ctggaccca gcctccccc cctcacaacc 1500

35 tgttgggact atgggggtgct aaaagggca actgcatggg aggccagcca ggaccctccg 1560

ES 2 272 093 T5

tcttcaaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc 1620
tgggctccag cgactgcctg aagggtgta aggaacccaa acacaaaatg tccaccttgc 1680
tggactccca cgagaggcca cagcccctga ggaagccaca tgctcaaaac aaagtcatga 1740
tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggag ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct 1800
tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc 1860
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctccccctgc 1920
tgtgcttgct cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtcccctc tctggtttgg 1980
tcttaagact attttccatt ctttcttgtc acattggaac tatccccatg aaaccttgg 2040
gggtggactg gtactcacac gacgaccagc tatttaaaaa gctcccaccc atctaagtcc 2100
accataggag acatggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc 2160
tctgcctgcc cagggagtat caccatgagg cgcccattca gataacacag aacaagaaat 2220
gtgcccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtaggt tttgggtcag 2280
agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc 2340
cccagcccag cctcccatgg atgctcgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa 2400
ggtgctggga ccccagggaa gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc 2460
ttttctctgg ctgggcctca gtatttcat tgataatgag ggggttgac aactgcctt 2520
tgattccttt caagtctaat gaattcctgt cctgatcacc tccccttcag tccctgcct 2580
ccacagcagc tgccctgatt tattaccttc aattaacctc tactccttcc tccatcccct 2640

ES 2 272 093 T5

gtccaccctt cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcagaagg 2700
tgtgctgagt acttaccctg cccaggccag ggaccctgcg gcacaagtgt ggcttaaatac 2760
ataagaagac cccagaagag aatgataat aataatacat aacagccgac gctttcagct 2820
atatgtgcca aatggatatt tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttgg 2880
ggcggcccat tttgcagaca ggaagaagag agaggtaag gaacttqccc aaqatqacac 2940
ctgcagtgag cgatggagcc ctggtgtttg aaccccagca gtcatttggc tccgagggga 3000
caggggtgcg aggagagctt tccaccagct ctagagcatc tgggaccttc ctgcaataga 3060
tgttcagggg caaaagcctc tggagacagg cttggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga 3120
gacgggcccg tccagggcag ggggtggccag gcgggccc accctcacgc ggcctctct 3180
ccacagacgt gtccgagtac agctgccgag agctgcactt caccgctac gtgaccgatg 3240
ggcgtgccg cagcgccaag ccggtcaccg agctggtgtg ctccggccag tgcggcccgg 3300
cgcgcctgct gcccaacgcc atcggccgag gcaagtgggtg gcgacctagt gggcccgact 3360
tccgctgcat ccccaccgc taccgcgcg agcgcgtgca gctgctgtgt cccgggtgtg 3420
aggcgccgag cgcgcgcaag gtgcgcctgg tggcctcgtg caagtgcaag cgcctcacc 3480
gcttccacaa ccagt.cggag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcgg ccgcagaagg 3540
gcccgaagcc gcggcccccgc gcccyagcy ccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg 3600
cctactagag cccgcccgc cccctccca ccggcgggag ccccggccct gaaccgcgc 3660
cccacattc tgcctctgc gcgtggttg attgtttata tttcattgta aatgcctgca 3720

ES 2 272 093 T5

accaggcca ggggctgag accttccagg ccctgaggaa tcccgggcgc cggcaaggcc 3780
cccctcagcc cgccagctga ggggtcccac ggggcagggg agggaattga gagtacaga 3840
cactgagcca cgcagccccg cctctggggc cgcctacctt tgctggtecc acttcagagg 3900
aggcagaaat ggaagcattt tcaccgccct ggggttttaa gggagcggtg tgggagtggg 3960
aaagtccagg gactggtaa gaaagtgga taagattccc ccttgcacct cgctgccccat 4020
cagaaagcct gaggcgtgcc cagagcacia gactgggggc aactgtagat gtggtttcta 4080
gtcctggctc tgccactaac ttgctgtgta accttgaact acacaattct ccttcgggac 4140
ctcaatttcc actttgtaa atgagggtgg aggtgggaat aggatctcga ggagactatt 4200
ggcatatgat tccaaggact ccagtgcctt ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga 4260
gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattg attcagtgcc aaggtcactt ccagaattca 4320
gagttgtgat gctctcttct gacagccaaa gatgaaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa 4380
agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgacaaact cctggaagaa gctatgctgc 4440
5 ttcccagcct ggcttccccg gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaaataa 4500
catcatccat tggggtagaa aaggagaggg tccgagggtg gtgggagggg tagaaatcac 4560
atccgcccc aacttcccaa gagcagcatc cctccccga cccatagcca tgttttaaag 4620
0 tcaccttccg aagagaagtg aaaggttcaa ggacactggc cttgcaggcc cgagggagca 4680
gcatcacia actcacagac cagcacatcc cttttgagac accgccttct gcccaccact 4740
5 cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc 4800

ES 2 272 093 T5

ttacactaaa agaataattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac 4860
tgagagcat aatagctgcc acccaaaaat ctttttgaaa atcatttcca gacaacctct 4920
5 tactttctgt gtagttttta attgttaaaa aaaaaaagt ttaaacagaa gcacatgaca 4980
tatgaaagcc tgcaggactg gtcgtttttt tggcaattct tccacgtggg acttgccac 5040
aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttattttct cacttaagtt 5100
atztatgcaa aagtttttct tntagagaat gacaatgta atattgcttt atgaattaac 5160
agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag 5220
gatgtggtct cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagt gacacccttc 5280
tcttggtcac tagagctcca accttgaca cacctttgac tgctctctgg tggccttgt 5340
ggcaattatg tcttcctttg aaaagtcatg tttatccctt cctttccaaa cccagaccgc 5400
atctcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tccttttagc agcctcccct 5460
ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcactc ccctgctcaa aagccttcca 5520
tagctcccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggccttctct 5580
gcttgactcc cacctccac tccaccaagc ttctactga ctccaaatgg tcatgcagat 5640
ccctgcttcc ttagtttgcc atccacactt agcaccceca ataactaatc ctctttcttt 5700
aggattcaca ttacttgtca tctcttcccc taacctcca gagatgttcc aatctcccat 5760
gatccctctc tcctctgagg ttecagcccc tttgtctac accactactt tggttcctaa 5820
ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta 5880

ES 2 272 093 T5

ctggcataga caacacaaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct 5940
tcttcgaagt gtggatttga tgcctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggccc 6000
agcctcctgc acttctctca aagtctcgcc tccccaaagg gtcttaatag tgctggatgc 6060
tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgccctaa 6120
ggtaggatgg tcaactggaa agctttaaata taagtccagc ctaccttggg ggaacccacc 6180
cccacaaaaga aagctgaggt ccctcctgat gacttgtcag ttaactacc aataaccac 6240
ttgaattaat catcatcatc aagtctttga taggtgtgag tgggtatcag tggccgggtcc 6300
cttcctgggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagtgagcc cctgcagaaa atccatgcat 6360
catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggtagga aacagagaca tcttccatcc 6420
ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgttgtt 6480
tgtttgtttg ttttgagaca gagtctcgct ctattgcccà ggctggagtg cagtgtcaca 6540
atctcggtt actgcaactt ctgccttccc ggattcaagt gattctcctg cctcagcctc 6600
cagagtagct gggattacag gtgctgcca ccacgcctgg ctaattttg tatttttgat 6660
agagacgggg tttcacatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct 6720
gcctgcctcg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccacà cccagccca 6780
ggttggtgtt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaatttt tgcccacagc 6840
catacttggg ctcaattcct tgcctaccc ctcaattgag ctgcttagaa cctgggtggc 6900
acatgggcaa taaccaggtc acactgttt gtaccaagtg ttatgggaat ccaagatagg 6960

ES 2 272 093 T5

agtaatttgc tctgtggagg ggatgagggga tagtggttag ggaaagcttc acaaagtggg 7020
tgttgcttag agattttcca ggtggagaag ggggcttcta ggcagaaggc atagcccaag 7080
5 caaagactgc aagtgcattg ctgctcatgg gtagaagaga atccaccatt cctcaacatg 7140
taccgagtcc ttgccatgtg caaggcaaca tgggggtacc aggaattcca agcaatgtcc 7200
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 ttaggggggc ggggcacatg 7440
ttctgggggt acagccagac tcagggcttg tattaatagt ctgagagtaa gacagacaga 7500
gggatagaag gaaataggtc cttttctctc tctctctctc tctctctctc actctctctc 7560
tctctcacac acacacacag acacacacac acgctctgta ggggtctact tatgctccaa 7620
gtacaaatca ggccacattt acacaaggag gtaaaggaaa agaacgttgagg aggagccaca 7680
ggaccccaaa attccctggt ttccttgaat caggcaggac ttacgcagct gggaggggtg 7740
agagcctgca gaagccacct gcgagtaagc caagttcaga gtcacagaca ccaaagctg 7800
gtgccatgtc ccacacccgc ccacctccca cctgctcctt gacacagccc tgtgctccac 7860
aaccggctc ccagatcatt gattatagct clygggctg caccgtcctt cctgccacat 7920
ccccaccca ttcttggaaac ctgccctctg tcttctcctt tgtccaaggg caggcaaggg 7980
ctcagctatt gggcagcttt gaccaacagc tgaggctcct tttgtggctg gagatgcagg 8040

ES 2 272 093 T5

aggcagggga atattcctct tagtcaatgc gaccatgtgc ctggtttgcc caggggtggc 8100
tcgtttacac ctgtaggcca agcgaatta ttaacagctc ccacttctac tctaaaaaat 8160
gaccaatct gggcagtaaa ttatatggtg cccatgctat taagagctgc aacttgctgg 8220
gcgtggtggc tcacacctgt aatcccagta ctttgggacg tcaaggcggg tggatcacct 8280
gaggtcacga gttagagact ggcttgcca gcatggcaaa accccatctt tactaaaaat 8340
acaaaaatta gcaaggcatg gtggcatgca cctgtaatcc caggtactcg ggaggctgag 8400
acaggagaat ggcttgaacc caggaggcag aggttgacgt gagccaagat tgtgccactg 8460
ccctccagcc ctggcaacag agcaagactt catctcaaaa gaaaaaggat actgtcaatc 8520
actgcaggaa gaaccagggt aatgaatgag gagaagagag gggctgagtc accatagtgg 8580
cagcaccgac tcctgcagga aaggcgagac actgggtcat ggggtactgaa gggtgccctg 8640
aatgacgttc tgcttagag accgaacctg agccctgaaa gtgcatgcct gttcatgggt 8700
gagagactaa attcatcatt ccttggcagg tactgaaatcc tttcttacgg ctgccctcca 8760
atgccaatt tcctacaat tgtctggggt gcctaagctt ctgccacca agagggccag 8820
agctggcagc gagcagctgc aggtaggaga gataggtacc cataaggag gtgggaaaga 8880
gagatggaag gagaggggtg cagagcacac acctccctg cctgacaact tcctgagggc 8940
tggatcatgcc agcagattta aggcggaggc aggggagatg gggcgggaga ggaagtgaaa 9000
aaggagaggg tgggatgga gaggaagaga ggggatcat tcattcattc cattgctact 9060
gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctct gggcatgtgg ttgtaatctt 9120

ES 2 272 093 T5

ggagcctcat ggagctcaca gggagtgctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa 9180

ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctgggtg 9240

agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag 9300

c 9301

LISTADO 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 METODOS PARA INCREMENTAR LA MINERALIZACION OSEA

<130>240083.508
- 15 <140>US
<141>1999-11-24

<160>41
- 20 <170>FastSEQ para Windows Versión 3.0

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

<400> 1
- | | |
|---|-----|
| agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctcctctggc tggtagcatg cagctcccac | 60 |
| tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg | 120 |
| ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcggg gagtaccg | 180 |
| agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagaac ggagggcggc | 240 |
| ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgact | 300 |
| tcaccgcgta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt | 360 |
- 30

ES 2 272 093 T5

gctccggcca gtgcggcccc gcgcgcctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtgg 420
ggcgacctag tgggccccgac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc 480
agctgctgtg tcccgggtgt gaggcgcccgc gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt 540
gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttccaca accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg 600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccg cccccggagc gccaaagcca 660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgccccg gccctcccc accggcgggc 720
gccccggccc tgaacccgcg cccacacatt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat 780
atctcattgt aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gaccttccag gccctgagga 840
atccccggcg ccggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg 900
gaggggaattg agagtcacag acaactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct 960
ttgctgggcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccgcc tggggtttta 1020
agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactggta agaaagtgg ataagattcc 1080
cccttgccacc tcgctgcccc tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg 1140
caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac 1200
tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgaggggt gaggtgggaa 1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg 1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtc 1380
caaggtcact tccagaattc agagtgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaa 1440
caaacagaaa aaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac 1500
tcctggaaga agctatgctg cttcccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctccac 1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggg 1620
gggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat cctcccccg 1680
accatagcc atgttttaaa gtcaccttcc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg 1740
ccttgcaggg ccgaggggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga 1800
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 aattgttaaa aaaaaaagt 2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160
atctatcttc tcacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatggt 2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g . . . 2301

5 <210>2
<211>213
<212>PRT
<213>Homo sapien
<400>2

ES 2 272 093 T5

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
 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
 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
 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
 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
 210

<210>2
 <211>2301
 <212>ADN

5

ES 2 272 093 T5

<213>Homo sapien

<400>3

```

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctccctctggc tggtagcatg cagctcccac      60
tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggctagg      120
ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aatcatccc cgagctcgga gtagtccccg      180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagaac ggagggcggc      240
ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcaact      300
tcaccgcgta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt      360
gctccggcca gtgcccggcg gcgcccctgc tgcccacgc catcggccgc ggcaagtggg      420
ggcgacctag tgggcccgcac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc      480
agctgctgtg tcccgggtgg gaggcgccgc gcgcccgcga ggtgcgcctg gtggcctcgt      540
gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttcacac accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg      600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcgccccg cgcgccgagc gccaaagcca      660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgcccgc gccctcccc accggcgggg      720
gccccggccc tgaaccgcgc ccccacattt ctgtcctctg cgcgtgggtt gattggttat      780
atctcattgt aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gaccttccag gccctgagga      840
atcccgggcg ccggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg      900
gagggcaattg agagtcacag aactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct      960
ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccgccc tggggtttta     1020
agggagcggg gtgggagtgg gaaagtccag ggactgggta agaaagtggg ataagattcc     1080
cccttgacc tcgctgccca tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg      1140
caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaa      1200
tacacaattc tccttcggga cctcaattt cactttgtaa aatgaggggt gaggtgggaa      1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg      1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtg      1380
caaggctact tccagaattc agagttgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa      1440
caaacagaaa aaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac      1500
tcctggaaga agctatgctg ctccccagcc tggcttcccc ggatggttgg ctacctccac      1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtcggagggg      1620
ggtagggagg atagaaatca catccgcccc aacttccca ayagcayca cctcccccy      1680
accatagcc atgttttaaa gtcaccttc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg      1740
ccttgacagg ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga      1800
caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc      1860
tcttacatgt gatggcatat cttactacta aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt      1920
gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tctttttgaa      1980

```

5

ES 2 272 093 T5

```

aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgttaa aaaaaaagt 2040
tttaaacaga agcacaatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160
atatttttc tcaacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatggt 2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gtaataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

```

<210>4
 <211>23
 <212>PRT
 <213>Homo sapien

5

<400>4

```

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

```

10

<210>5
 <211>2301
 <212>ADN
 <213>Homo sapien

<400>5

```

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
ctccccacca ccccttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact 300
tcacccgcta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgcaca gccggtcacc gagctggtgt 360
gctccggcca gtgcggcccc gcgcgcctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtggg 420
ggcgacctag tgggcccagc ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc 480
agctgctgtg tcccgggtgg gaggcgccgc gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt 540
gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttcaca accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg 600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccg cccccggagc gccaaagcca 660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgccccg gccctcccc accggcgggc 720

```

20

ES 2 272 093 T5

gccccggccc tgaacccgcg cccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat	780
atcttcattgt aaatgcctgc aacccagggc agggggctga gaccttccag gccctgagga	840
atccccggcg cgggcaaggc cccccacagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg	900
gaggggaattg agagtccag acactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct	960
ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccgccc tggggtttta	1020
agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactgggta agaaagtggg ataagattcc	1080
cccttgacc tcgctgccc tcaaaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg	1140
caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aacctgaac	1200
tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgagggg gaggtgggaa	1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga tcccaaggac tccagtgcct tttgaatggg	1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaataaatg cagttgcatt gattcagtc	1380
caaggtcact tccagaattc agagttgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaa	1440
caaacagaaa aaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac	1500
tcctggaaga agctatgctg cttcccagcc tggcttcccc ggatggttg ctacctccac	1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgaggg	1620
ggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aacttccaa agagcagcat ccctccccg	1680
acccatagcc atgttttaaa gtcaccttcc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg	1740
ccttgagcgc cggagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga	1800
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
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc	2100
ttccacgtgg gacttgctca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat	2160
atctattttc tcacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatgtt	2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gtaataaag	2280
acaatgaatc atgaccgaaa g	2301

<210>6
 <211>213
 <212>PRT
 5 <213>Homo sapien

<400>6

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Ile Cys Leu Leu Val His Thr
 1 5 10 15

10

ES 2 272 093 T5

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
 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
 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
 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
 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
 210

<210>7
 <211>2301
 <212>ADN
 <213>Homo sapien

<400>7

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctccctctggc tggtagcatg cagctcccac 60
 tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg 120
 ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccg cgagctcgga gattaccctg 180

10

ES 2 272 093 T5

agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagaac ggagggcggc 240
 ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgteccgagta cagctgccgc gagctgcact 300
 tcacccgcta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgcaa gccggtcacc gagctggtgt 360
 gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtgg 420
 ggcgacctag tgggcccgcac ttcgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc 480
 agctgctgtg tcccgttggg gaggcgcccg gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt 540
 gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttcaca accagtgcga gctcaaggac ttcgggaccg 600
 aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccg cgcggcggagc gccaaagcca 660
 accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgcccgc gccctcccc accggcgggc 720
 gccccggccc tgaaccgcg cccacattt ctgtcctctg cgcgtgggtt gattgtttat 780
 atttcattgt aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gacctccag gccctgagga 840
 atccccggcg cgggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg 900
 gagggattg agagtacag aactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct 960
 ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccgccc tggggtttta 1020
 agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactgggta agaaagtgg ataagattcc 1080
 cccttgacc tcgctgcca tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg 1140
 caactgtaga tgtggtttct agtccctggct ctgccactaa cttgctgtgt aacctgaac 1200
 tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgaggggt gaggtgggaa 1260
 taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg 1320
 cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaataatg cagttgcatt gattcagtgc 1380
 caaggtcact tccagaattc agagtgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa 1440
 caaacagaaa aaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac 1500
 tcctggaaga agctatgctg ctcccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctccac 1560
 ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggg 1620
 ggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat ccctcccccg 1680
 acccatagcc atgttttaaa gtcaccttcc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg 1740
 ccttgaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga 1800
 caccgcttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc 1860
 tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt 1920
 gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc caccacaaaa tcttttgaa 1980
 aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgtttaa aaaaaaaggt 2040
 tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
 ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtgggt tttaaagagt taagttacat 2160
 atttatttcc tcacttaagt tatttatgca aaagttttcc ttgtagagaa tgacaatgtt 2220
 aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag 2280
 acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

<210>8
 <211>213
 <212>PRT
 <213>Homo sapien

5

<400>8

ES 2 272 093 T5

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
 Ala Thr Glu Ile Ile Arg 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
 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
 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
 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
 210

ES 2 272 093 T5

<210>9
 <211>642
 <212>ADN
 <213>Cercopithecus pygerythrus

5

<400>9
 atgcagctcc cactggccct gtgtcttgtc tgcctgctgg tacacgcagc cttccgtgta 60
 gtggagggcc aggggtggca ggccttcaag aatgatgccca cggaaatcat ccccgagctc 120
 ggagagtacc ccgagcctcc accggagctg gagaacaaca agaccatgaa ccgggcggag 180
~~aatggagggc ggcctcccca ccaccccttt gagaccaaag acgtgtccga gtacagctgc 240~~
 cgagagctgc acttcacccg ctacgtgacc gatgggcccgt gccgcagcgc caagccagtc 300
 accgagttgg tgtgtccggg ccagtgcggc ccggcacgcc tgctgcccga cgccatcggc 360
 cgcggaagt ggtggcgcgc gagtgggccc gacttccgct gcatccccga ccgctaccgc 420
 gcgcagcgtg tgcagctgct gtgtcccggg ggtgccgcgc cgcgcgcgcg caaggtgcgc 480
 ctgggtggcct cgtgcaagtg caagcgctcc acccgcttcc acaaccagtc ggagctcaag 540
 gacttcggtc ccgaggccgc tcggccgcag aagggccgga agcccgggcc ccgcccggg 600
 ggggccaag ccaatcaggc cgagctggag aacgcctact ag 642

<210>10
 <211>213
 <212>PRT
 <213>Cercopithecus pygerythrus

10

<400>10
 15
 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
 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

ES 2 272 093 T5

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
 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 Ala 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
 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
 Leu Glu Asn Ala Tyr
 210

5 <210>11
 <211>638
 <212>ADN
 <213>Mus musculus

<400>11

atgcagccct cactagcccc gtgcctcatc tgcctacttg tgcacgctgc cttctgtgct 60
 gtggagggcc aggggtggca agccttcagg aatgatgcca cagaggatcat cccagggcctt 120
 ggagagtacc ccgagcctcc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatgga 180
 ggcagacctc cccaccatcc ctatgacgcc aaagggtgtgt ccgagtacag ctgccgcgag 240
 ctgcactaca cccgcttctc gacagacggc ccatgccgca gcgccaagcc ggtcaccgag 300
 ttggtgtgct ccggccagtg cggccccgcg cggtctgtgc ccaacgccat cgggcgcggtg 360
 aagtgggtggc gcccgaaacgg accggatttc cgctgcatcc cggatcgcta ccgcgcgagc 420
 cgggtgcagc tgcctgtgcc cgggggcgcg gcgccgcgct cgcgcaaggt gcgtctggtg 480
 gcctcgtgca agtgcaagcg cctcaccgca ttccacaacc agtcggagct caaggacttc 540
 gggccggaga ccgcgcggcc gcagaagggc cgcaagccgc ggcccggcgc ccggggagcc 600
 aaagccaacc aggcggagct ggagaacgcc tactagag 638

10

15 <210>12
 <211>211
 <212>PRT
 <213>Mus musculus

<400>12

ES 2 272 093 T5

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
 20 25 30
 Ala Thr Glu Val Ile Pro Gly Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35 40 45
 Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro
 50 55 60
 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
 Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu
 100 105 110
 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
 Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg Leu Val
 145 150 155 160
 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
 Pro Arg Pro Gly Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu
 195 200 205
 Asn Ala Tyr
 210

<210>13
 <211>674
 5 <212>ADN
 <213>Rattus norvegicus
 <400>13

ES 2 272 093 T5

```

gaggaccgag tgcccttcct ccttctggca ccatgcagct ctactagcc ccttgcttg      60
cctgcctgct tgtacatgca gccttcggtg ctgtggagag ccaggggtgg caagccttca    120
agaatgatgc cacagaaatc atcccgggac tcagagagta cccagagcct cctcaggaac    180
tagagaacaa ccagaccatg aaccgggccc agaacggagg cagaccccc caccatcctt     240
atgacaccaa agacgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc cgcttcgtga    300
ccgacggccc gtgccgcagt gccaagccgg tcaccgagtt ggtgtgctcg ggccagtgcg    360
gccccgcgcg gctgctgccc aacgccatcg ggcgcgtgaa gtggtggcgc ccgaacggac   420
ccgacttccg ctgcatcccg gatcgtacc gcgcgcagcg ggtgcagctg ctgtgccccg    480
gcgggcgggc gccgcgctcg cgcaaggtgc gtctggtggc ctctgcaag tgcaagcggc    540
tcaccgcctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg acctgagacc gcgcggccgc    600
agaagggctg caagccgcgg ccccgcgcc ggggagccaa agccaaccag gcggagctgg    660
agaacgccta ctag                                                         674

```

<210>14
 <211>213
 <212>PRT
 <213>Rattus norvegicus

5

<400>5

```

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
      20                25                30
Ala Thr Glu Ile Ile Pro Gly Leu Arg Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Gln
      35 -                40                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
65                -70                75                80
Arg Glu Leu His Tyr Thr Arg Phe 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

```

10

ES 2 272 093 T5

	100		105		110
	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				
	130		135		140
	Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg				
	145		150		155
	Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln				
		165		170	
	Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly				
		180		185	
	Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu				
	195		200		205
	Leu Glu Asn Ala Tyr				
	210				

<210>5
 <211>2301
 <212>ADN
 <213>Homo sapien

5

<400>5

agaatgatgc cacagaaatc atccccgagc tgggcgagta ccccgagcct ctgccagagc	60
tgaacaacaa gaccatgaac cgggcggaga acggaggag acctccccac caccctttg	120
agaccaaaga cgcctccgag tacagctgcc gggagctgca cttcaccgc tacgtgaccg	180
atgggcccgtg ccgcagcgc aagccggtca ccgagctggt gtgctcgggc cagtgcggcc	240
cggcgcgcct gctgcccac gccatcggcc gcggcaagt gtggcgcaca agcgggccc	300
acttccgctg catccccgac cgctaccgc cgcagcgggt gcagctgtt tgcctggcg	360
gcgcggcgcc gcgcgcgc aaggtgcgc tggcggcctc gtgcaagtgc aagcgcctca	420
ctcgcttcca caaccagtcc gagctcaagg acttcgggcc cgaggccgc cggccgaaa	480
cgggccqaaa actgcggccc cggcggggg gcaccaaagc cagccgggcc ga	542

10

<210>16
 <211>176
 <212>PRT
 <213>Bos torus

15

<400>16

ES 2 272 093 T5

cgcgtttttg	tgagcagcaa	tattgcgctt	cgatgagcct	tggcgttgag	attgatacct	60
ctgctgcaca	aaaggcaatc	gaccgagctg	gaccagcgca	ttcgtgacac	cgtctccttc	120
gaacttattc	gcaatggagt	gtcattcatc	aaggacngcc	tgatcgcaaa	tgggtctatc	180
cacgcagcgg	caatcgaaaa	ccctcagccg	gtgaccaata	tctacaacat	cagccttggg	240
atcctgcgtg	atgagccagc	gcagaacaag	gtaaccgtca	gtgccgataa	gttcaaagtt	300
aaacctgggt	ttgataccaa	cattgaaacg	ttgatcgaaa	acgcgctgaa	aaacgctgct	360
gaatgtgcgg	cgctggatgt	cacaaagcaa	atggcagcag	acaagaaagc	gatggatgaa	420
ctggcttctc	atgtccgcac	ggccatcatg	atggaatggt	tccccggggg	tgttatctgg	480
cagcagtgcc	gtcgatagta	tgcaattgat	aattattatc	atctgcgggt	cctttccggc	540
gatecgectt	gtaacggggc	ggcgacctcg	cgggttttcg	ctatctatga	aaatcttccg	600
gtttaaggcg	tttccgttct	tcttcgctcat	aacttaatgt	ttttatttaa	aataccctct	660
gaaaagaaag	gaaacgacag	gtgctgaaag	cgagcttttt	ggcctctgtc	gtttcctttc	720
tctgtttttg	tccgtggaat	gaacaatgga	agtcaacaaa	aagcagagct	tatcgatgat	780
aagcggtaaa	acatgagaat	tcgcggcccg	ataatacgac	tcactatagg	gatcgacgcc	840
tactccccgc	gcatgaagcg	gaggagctgg	actccgcctg	cccagagacg	cccccaacc	900
cccaaagtgc	ctgacctcag	cctctaccag	ctctggcttg	ggcttggggc	gggtcaaggc	960
taccacgttc	tcttaacagg	tggctgggct	gtctcttggc	cgcgcgctcat	gtgacagctg	1020
cctagtctcg	cagtgaggtc	accgtggaat	gtctgccttc	gttgccatgg	caacgggatg	1080
acgttacaat	ctgggtgtgg	agcttttctc	gtccgtgtca	ggaaatccaa	ataccctaaa	1140
ataccctaga	agaggaagta	gctgagccaa	ggctttcctg	gcttctccag	ataaagtttg	1200
acttagatgg	aaaaaaacaa	aatgataaag	acccgagcca	tctgaaaatt	cctcctaatt	1260
gcaccactag	gaaatgtgta	tattattgag	ctcgtatgtg	ttcttatttt	aaaagaaaa	1320
ctttagtcac	gttattaata	agaatttctc	agcagtggga	gagaaccaat	attaacacca	1380
agataaaagt	tggcatgac	cacattgcag	gaagatccac	gttgggtttt	catgaatgtg	1440
aagaccccat	ttattaaagt	cctaagctct	gtttttgcac	actaggaagc	gatggccggg	1500
atggctgagg	ggctgtaagg	atctttcaat	gtcttacatg	tgtgttctct	gtcctgcacc	1560
taggacctgc	tcctagcct	gcagcagagc	cagaggggtt	tcacatgatt	agtctcagac	1620
acttgggggc	aggttgcatg	tactgcatcg	cttatttcca	tacggagcac	ctactatgtg	1680
tcaaacacca	tatggtgttc	actcttcaga	acgggtgggtg	tcatcatggt	gcatctgctg	1740
acggttggat	tgggtgtaga	gagctgagat	atatggacgc	actcttcagc	attctgtcaa	1800
cgtggctqtq	cattcttgct	cctgagcaag	rggrraaca	gactcacagg	gtcagcctcc	1860
agctcagtcg	ctgcatagtc	ttagggaaacc	tctcccagtc	ctccctacct	caactatcca	1920
agaagccagg	gggcttggcg	gtctcaggag	cctgcttgcct	gggggacagg	ttggtgagtt	1980
ttatctgcag	taggttgctt	aggcatagtg	tcaggactga	tggctgcctt	ggagaacaca	2040
tcctttgccc	tctatgcaaa	tctgaccttg	acatgggggc	gctgctcagc	tgggaggatc	2100
aactgcatac	ctaaagccaa	gcctaaagct	tcttcgtcca	cctgaaactc	ctggaccaag	2160

ES 2 272 093 T5

gggcttccgg cacatcctct caggccagtg agggagtctg tgtgagctgc actttccaat 2220
 ctcagggcgt gagaggcaga gggaggtggg ggcagagcct tgcagctctt tcctcccatc 2280
 tggacagcgc tctggctcag cagcccatat gagcacaggc acatccccac cccaccccca 2340
 cctttcctgt cctgcagaat ttaggtctctg ttcacggggg gggggggggg ggggcagtcc 2400
 tatectctct taggtagaca ggactctgca ggagacactg ctttctaaga tactgcagtt 2460
 taaatttggg tggtgtgagg ggaaagcga gggcctcttt gaccattcag tcaaggtacc 2520
 ttctaactcc catcgtattg gggggctact ctagtgtctag acattgcaga gagcctcaga 2580
 actgtagtta ccagtgtggt aggattgatc cttcagggag cctgacatgt gacagttcca 2640
 ttcttcaccc agtcaccgaa catttattca gtacctacc cgtaacaggc accgtagcag 2700
 gtactgaggg acggaccact caaagaactg acagaccgaa gccttggaa ataaacacca 2760
 aagcatcagg ctctgccaac agaactctt ttaactca ggcctttaa cactcaggac 2820
 cccaccccc accccaagca gttggcactg ctatccacat tttacagaga ggaaaaacta 2880
 ggcacaggac gatataagt gcttgcttaa gcttgtctgc atggtaaatg gcagggctgg 2940
 attgagaccc agacattcca actctagggg ctatttttct ttttctcgt tgttcgaatc 3000
 tgggtcttac tgggtaaact caggctagcc tcacactcat atccttctcc catggcttac 3060
 gagtgctagg attccagggt tgtgctacca tgtctgactc cctgtagctt gtctatacca 3120
 tcctcacaac ataggaatg tgatagcagc acacacaccg gaaggagctg gggaaatccc 3180
 acagagggct ccgcaggatg acaggcgaat gcctacacag aagggtggga agggaagcag 3240
 agggaacagc atgggcgtgg gaccacaagt ctatttgggg aagctgccgg taaccgtata 3300
 tggctggggg gaggggagag gtcatgagat gaggcaggaa gagccacagc aggcagcggg 3360
 tacgggctcc ttattgcca gaggtctgga tcttctctct cttcctcctt ccggggctgc 3420
 ctgttcattt tccaccactg cctcccatcc aggtctgtgg ctcaggacat caccagctg 3480
 cagaaactgg gcatcaccca cgtcctgaat gctgccgagg gcaggtcctt catgcacgtc 3540
 aacaccagtg ctagcttcta cgaggattct ggcacacct acttgggcat caaggccaat 3600
 gatacgcagg agttcaacct cagtgtctac tttgaaagg ccacagattt cattgaccag 3660
 gcgctggccc ataaaaatg taaggaacgt acattccggc acccatggag cgtaagccct 3720
 ctgggacctg cttcctccaa agaggcccc acttgaaaaa ggttccagaa agatcccaaa 3780
 atatgccacc aactagggat taagtgtcct acatgtgagc cgatggggg cactgcatat 3840
 agtctgtgcc atagacatga caatggataa taatatttca gacagagagc aggagttagg 3900
 tagctgtgct ctttccctt taattgagtg tgcccattt tttattcatg tatgtgata 3960
 catgtgtgtg cacacatgcc ataggtgat actgaacacc gtcttcaatc gttccccacc 4020
 ccacctatt ttttgaggca gggctcttc cctgatcctg gggctcattg gtttatctag 4080
 gctgctggcc agtgagctct ggagttctgc ttttctctac ctccctagcc ctgggactgc 4140
 aggggcatgt gctgggcccag gcttttatgt cgcgttgggg atctgaactt aggtccctag 4200
 gcctgagcac cgtaaagact ctgccacatc cccagcctgt ttgagcaagt gaaccattcc 4260
 ccagaattcc cccagtgggg ctttctacc cttttattgg ctaggcattc atgagtggtc 4320

ES 2 272 093 T5

acctcgccag	aggaatgagt	ggccacgact	ggctcaggg	cagcagccta	gagatactgg	4380
gttaagtctt	cctgccgctc	gctccctgca	gccgcagaca	gaaagtagga	ctgaatgaga	4440
gctggctagt	ggtcagacag	gacagaaggg	tgagaggggtc	acagggcaga	tgtcagcaga	4500
gcagacaggt	tctccctctg	tgggggaggg	gtggcccact	gcaggtgtaa	ttggccttct	4560
ttgtgctcca	tagaggcttc	ctgggtacac	agcagcttcc	ctgtcctggg	gattcccaaa	4620
gagaactccc	taccactgga	cttacagaag	ttctattgac	tggtgtaacg	gttcaacagc	4680
tttggctctt	ggtggacggg	gcatactgct	gtatcagctc	aagagctcat	tcacgaatga	4740
acacacacac	acacacacac	acacacacac	acacaagcta	atthttgat	gccttaacta	4800
gctcagtgac	tgggcatttc	tgaacatccc	tgaagttagc	acacatttcc	ctctgggtgt	4860
cctggettaa	caeettetaa	atctatattt	tatctttgct	gccttggtac	cttctgagaa	4920
gcccttaggg	ccacttccct	tcgcacctac	attgtctggat	ggtttctctc	ctgcagctct	4980
taaattctgat	ccctctgcct	ctgagccatg	ggaacagccc	aataactgag	ttagacataa	5040
aaacgtctct	agccaaaact	tcagctaaat	ttagacaata	aatcttactg	gttgtggaat	5100
ccttaagatt	cttcatgacc	tctttcacat	ggcacgagta	tgaagcttta	ttacaattgt	5160
ttattgatca	aactaactca	taaaaagcca	gttgtctttc	acctgctcaa	ggaaggaaca	5220
aaattcatcc	ttaactgatc	tgtgcacctt	gcacaatcca	tacgaatata	ttaagagtac	5280
taagatthtg	gttgtgagag	tcacatgtta	cagaatgtac	agctttgaca	aggtgcatcc	5340
ttgggatgcc	gaagtgacct	gctgttccag	ccccctacct	tctgaggctg	ttttggaagc	5400
aatgctctgg	aagcaacttt	aggaggtagg	atgctggaac	agcgggtcac	ttcagcatcc	5460
cgatgacgaa	tcccgtcaaa	gctgtacatt	ctgtaacaga	ctgggaaagc	tgcagacttt	5520
aaggccaggg	ccctatggtc	cctcttaatc	cctgtcacac	ccaacccgag	cccttctcct	5580
ccagccgttc	tgtgcttctc	actctggata	gatggagaac	acggccttgc	tagttaaagg	5640
agtgaggctt	cacccttctc	acatggcagt	ggttgggtcat	cctcattcag	ggaactctgg	5700
ggcattctgc	ctttacttcc	tctttttgga	ctacagggaa	tatatgctga	cttgttttga	5760
ccttgtgtat	ggggagactg	gatctttggg	ctggaatggt	tcctgctagt	ttttcccat	5820
cctttggcaa	accctatcta	tatcttacca	ctaggcatag	tggccctcgt	tctggagcct	5880
gccttcaggg	tggttctcgg	ggaccatgct	cctggtttct	cccagcata	tggtgttcac	5940
agtgttcact	gcgggtgggt	gctgaacaaa	gcggggattg	catcccagag	ctccgggtgcc	6000
ttgtgggtac	actgctaaga	taaaatggat	actggcctct	ctctgaccac	ttgcagagct	6060
ctgggtgcct	gtgggtacac	tgctaagata	aaatggatac	tggcctctct	ctatccactt	6120
gcaggactct	agggaaacaq	aatccattac	tgagaaaaac	aggggctagg	agcagggagg	6180
tagctgggca	gctgaagtgc	ttggcgacta	accaatgaat	accagagttt	ggatctctag	6240
aatactctta	aaatctgggt	gggcagagtg	gcctgcctgt	aatcccagaa	ctcgggaggg	6300
ggagacaggg	aatcatcaga	gcaaaactgg	taaccagaat	agcaaaaac	tgagctctgg	6360
gctctgtgag	agatcctgcc	ttaacatata	agagagagaa	taaaacattg	aagaagacag	6420
tagatgccaa	ttttaagccc	ccacatgcac	atggacaagt	gtgcgtttga	acacacatat	6480

ES 2 272 093 T5

gcactcatgt gaaccaggca tgcacactcg ggcttatcac acacataatt tgaagagag 6540
 agtgagagag gagagtgcac attagagttc acaggaaagt gtgagtgagc acacccatgc 6600
 acacagacat gtgtgccagg gagtaggaaa ggagcctggg tttgtgtata agagggagcc 6660
 atcatgtgtt tctaaggagg gcgtgtgaag gaggcgttgt gtgggctggg actggagcat 6720
 ggttgtaaact gagcatgctc cctgtgggaa acaggagggg ggccaccctg cagaggggtcc 6780
 cactgtccag cgggatcagt aaaagccctc gctgagaact ttaggtaata gccagagaga 6840
 gaaaggtagg aaagtggggg gactcccatc tctgatgtag gaggatctgg gcaagtagag 6900
 gtgcgtttga ggtagaaaga ggggtgcaga ggagatgctc ttaattctgg gtcagcagtt 6960
 tctttccaaa taatgcctgt gaggaggtgt aggtgggtggc cattcactca ctcagcagag 7020
 ggatgatgat gcccgggtgga tgctggaaat ggccgagcat caaccctggc tctggaagaa 7080
 ctccatcttt cagaaggaga gtggatctgt gtatggccag cggggtcaca ggtgcttggg 7140
 gcccttgggg gactcctagc actgggtgat gtttatcgag tgctcttgtg tgccaggcac 7200
 tggcctgggg ctttgtttct gtctctgttt tgtttcgttt tttgagacag actcttgcta 7260
 tgratccgtg tcaatcttgg aatctcactg catagcccag gctgcggaga gaggggaggg 7320
 caataggcct tgrtaagcaag ccacacttca gagactagac tccaccctgc gaatgatgac 7380
 aggtcagaqc tgagtcccg aagatTTTTT ttccagctgc cagggtggagt gtggagtggc 7440
 agctagcggc aagggtagag ggcgagctcc ctgtgcagga gaaatgcaag caagagatgg 7500
 caagccagtg agttaagcat tctgtgtggg gagcaggtgg atgaagagag aggctgggct 7560
 ttcgcctctg gggggggggg gaggggtggg gatgaggtga gaggagggca gctccctgca 7620
 gtgtgatgag atttttcctg acagtgacct ttggcctctc cctccccac ttccttctt 7680
 tcctttcttc ccaccattgc tttccttgtc cttgagaaat tctgagtttc cacttcaactg 7740
 gtgatgcaga cgaaacaga agccgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 7800
 gtgtgtgtgt ttgtgtgtat gtgtgtgtgt gtgtttgtgt gtatgtgtgt cagtgggaat 7860
 ggctcatagt ctgcaggaag gtgggcagga aggaataagc tgtaggctga ggcagtgtgg 7920
 gatgcagggg gagaggagag gagggatacc agagaaggaa attaaggagag ctacaagagg 7980
 gcattgttgg ggtgtgtgtg tgtgtgtgtt gtttatattt gtattggaaa tacattcttt 8040
 taaaaaatac ttatccattt atttatTTTT atgtgcacgt gtgtgtgcct gcatgagttc 8100
 atgtgtgcca cgtgtgtgcg ggaacccttg gaggccacaa gggggcatct gatcccctgg 8160
 aactggagtt ggaggaggtt gtgagtcccc tgacatgttt gctgggaact gaaccccggt 8220
 cctatgcaag agcaggaagt gcagttatct gctgagccat ctctccagtc ctgaaatcca 8280
 ttctcttaaa atacacgtgg cagagacatg atgggattta cgtatggatt taatgtggcg 8340
 gtcattaagt tccggcacag gcaagcacct gtaaagccat caccacaacc gcaacagtga 8400
 atgtgaccat ccccccatg ttcttcatgt ccctgtccc ctccatcctc cattctcaag 8460
 cacctcttgc tctgcctctg tcgctggaga acagtgtgca tctgcacact cttatgtcag 8520
 tgaagtcaca cagcctgcac cccttcttgg tctgagtatt tgggttctga ctctgctatc 8580
 acacactact gtactgcatt ctctcgctct ctttttttaa acatattttt atttgtttgt 8640

ES 2 272 093 T5

gtgtatgcac atgtgccaca tgtgtacaga tactatggag gccagaagag gccatggccg	8700
tccctggagc tggagttaca ggcagcgtgt gagctgcctg gtgtgggtgc tgggaaccaa	8760
acttgaatct aaagcaagca cttttaactg ctgaggcagc tctcagtacc cttcttcatt	8820
tctccgctg ggttccattg tatggacaca tgtagctaga atatcttgc tctctaatta	8880
tgtacattgt tttgtgctaa gagagagtaa tgctctatag cctgagctgg cctcaacctt	8940
gccatcctcc tgcctcagcc tcctcctcct gagtgctagg atgacaggcg agtggtaact	9000
tacatggttt catgttttgt tcaagactga aggataacat tcatacagag aaggctctggg	9060
tcacaaagtg tgcagttcac tgaatggcac aaccctgat caagaaacaa aactcagggg	9120
ctggagagat ggcactgact gctcttccag aggtccggag ttcaattccc agcaaccaca	9180
tggtggetca eageeateta taaegagate tgaagccctc ttctgggtgtg tctgaagaca	9240
gctacagtgt actcacataa aataaataaa tctttaaaac acacacacac acacaattac	9300
caccccagaa agcccactcc atgttccctc ccacgtctct gcctacagta ctcccaggtt	9360
accactgttc aggccttctaa caacctgggt tacttgggcc tcttttctgc tctgtggagc	9420
cacacatttg tgtgcctcat acacgttctt tctagtaagt tgcataattac tctgcgtttt	9480
tacatgtatt tatttattgt agttgtgtgt gcgtgtgggc ccatgcatgg cacagtgtgt	9540
ggggatgtca gagtattgtg aacaggggac agttcttttc ttcaatcatg tgggttccag	9600
aggttgaact caggtcatca tgtgtggcag caaatgcctt taccactga gacatctcca	9660
tattcttttt ttttcccctg aggtgggggc ttgttccata gcccaaactg gctttgact	9720
tgcagttcaa agtgactccc tgtctccacc tcttagagta ttggaattac gatgtgtact	9780
accacacctg actggatcat taattctttg atgggggagg ggaagcgcac atgctgcagg	9840
tgaagggatg actggactgg acatgagcgt ggaagccaga gaacagcttc agtctaatgc	9900
tctcccaact gagctatttc ggtttgccag agaacaactt acagaaagt ctcagtgccca	9960
tgtggattcg gggttggagt tcaactcatc agcttgacat tggctcctct acccactgag	10020
ccttctcact actctctacc tagatcatta attctttttt aaaaagactt attagggggc	10080
tggagagatg gctcagccgt taagagcacc gaatgccctt ccagaggtcc tgagttcaat	10140
tcccagcatg ccattgctgg gcagtagggg gcgcaggtgt tcaacgtgag tagctgttgc	10200
cagttttccg cggtaggagaa cctcttgaca ccctgctgtc cctggtcatt ctgggtgggt	10260
gcatggatg atgcttgttg tatggaagac tttgactgtt acagtgaagt tgggcttcca	10320
cagttaccac gtctcccctg tttcttgag gccgggtgct tgtccattgc cgcgagggtc	10380
acagccgctc cccaacgcta gttatcgctt acctcatgat gcggcagaag atggacgtca	10440
agtctgctct gagtactgtg aggcagaatc qtqagatcgg ccccaacgat ggcctcctgg	10500
cccaactctg ccagctcaat gacagactag ccaaggaggg caaggtgaaa ctctaggggtg	10560
cccacagcct cttttgcaga ggtctgactg ggagggccct ggcagccatg tttaggaac	10620
acagtatacc cactcccctg accaccagac acgtgccac atctgtccca ctctggctct	10680
cgggggccac tccaccctta gggagcaca gaagaagctc cctaagaagt tctgctcctt	10740
agccatcctt tctgttaatt tatgtctctc cctgaggtga gggtcaggtt tatgtcccctg	10800

ES 2 272 093 T5

tctgtggcat agatacatct cagtgaccca ggggtgggagg gctatcaggg tgcattggccc 10860
 gggacacggg cactcttcat gaccctccc ccacctgggt tcttctctgtg tgggccagaa 10920
 ccacgagcct ggtaaaggaa ctatgcaaac acaggccctg acctccccat gtctgttctt 10980
 ggtcctcaca gcccgacacg cctgctgag gcagacgaat gacattaagt tctgaagcag 11040
 agtggagata gattagtgc tagatttcca aaaagaagga aaaaaaggc tgcattttaa 11100
 aattatttcc ttagaattaa agatactaca taggggccct tgggtaagca aatccatttt 11160
 tcccagaggc tatcttgatt ctttggaatg tttaaagtgt gccttgccag agagcttacg 11220
 atctatatct gctgcttcag agccttccct gaggatggct ctgttctttt gcttgtaga 11280
 agagcgatgc cttgggcagg gtttccccct tttcagaata caggggtgaa agtccagcct 11340
 attacaaaca aacaaacaaa caaacaacaa aaggacctcc atttggagaa ttgcaaggat 11400
 tttatcctga attatagtgt tggtgagtcc aagtcacac gccaaagtgc tgccatcctg 11460
 gttgctattc taagaataat tagggaggag aacctagcca attgcagctc atgtccgtgg 11520
 gtgtgtgcac ggggtgcatat gttggaaggg gtgcctgtcc ccttggggac agaaggaaaa 11580
 tgaaaggccc ctctgctcac cctggccatt tacgggaggc tctgctggtt ccacgggtgc 11640
 tgtgcaggat cctgaaactg actcgctgga cagaaacgag acttggcggc accatgagaa 11700
 tggagagaga gagagcaaaag aaagaaacag cctttaaag aactttctaa ggggtggtttt 11760
 tgaacctcgc tggacctgt atgtgtgcac atttgccaga gattgaacat aatcctcttg 11820
 ggacttcacg ttctcattat ttgtatgtct ccggggctac gcagagccgt cagccaccac 11880
 cccagcacc cgcacatagg cgtctcataa aagcccattt tatgagaacc agagctgttt 11940
 gagtaccctg tgtatagaga gagttgtgtt cgtggggcac ccggatccca gcagcctggt 12000
 tgctgcctg taggatgtct tacaggagtt tgcaagagaa ccttctcttg agggaaagaa 12060
 atatcagggg tttttgttga atatttcaaa ttcagcttta agtgaagac tcagcagtg 12120
 tcatggttaa ggtaaaggaa atgccttttc cagagctgct gcaagaggca ggagaagcag 12180
 acctgtctta ggatgtcact cccagggtaa agacctctga tcacagcagg agcagagctg 12240
 tgcagcctgg atggtcattg tcccctattc tgtgtgacca cagcaaccct ggtcacatag 12300
 ggctggcat cctttttttt tttttttttt tttttttttg gcccagaatg aagtgacct 12360
 agccaagtgt tgtacctcag tctttagttt ccaagcggct ctcttgctca atacaatgtg 12420
 cttttcaaaa taacctgta gagttgacag aactggttca tgtgttatga gagaggaaaa 12480
 gagaggaaa aacaaaacaa aacaaaacac cacaaaccaa aaacatctgg gctagccagg 12540
 catgattgca atgtctacag gccagttca tgagaggcag agacaggaag accgccgaaa 12600
 ggtcaaggat agcatggtct acgtatcgag actcagcca gggctacggt cccaagatcc 12660
 taggttttgg attttgggct ttggtttttg agacagggtt tctctgtgta gccctggctg 12720
 tcctggaact cgctctgtag accaggctgg cctcaaaact agagatctgc ctgactctgc 12780
 ctttgagggc tgggacgaat gccaccactg cccaactaag attccattaa aaaaaaaaaa 12840
 agttcaagat aattaagagt tgccagctcg ttaaagctaa gtagaagcag tctcagcct 12900
 gctgcttgag gctgttcttg gcttggacct gaaatctgcc cccaacagtg tccaagtgca 12960

ES 2 272 093 T5

catgactttg	agccatctcc	agagaaggaa	gtgaaaattg	tggctcccca	gtcgattggg	13020
acacagtctc	tctttgtcta	ggtaacacat	ggtgacacat	agcattgaac	tctccactct	13080
gagggtgggt	tccctcccc	ctgcctcttc	tgggttggtc	accccatagg	acagccacag	13140
gacagtcact	agcacctact	ggaaacctct	ttgtgggaac	atgaagaaag	agcctttggg	13200
agattcctgg	ctttccatta	gggctgaaa	tacaacgggt	cttggttggc	tttgcctcgt	13260
gtttataaaa	ctagctacta	ttcttcaggt	aaaataccga	tgttgtggaa	aagccaaccc	13320
cgtggctgcc	cgtgagtagg	gggtgggggt	gggaatcctg	gatagtgttc	tatccatgga	13380
aagtggtgga	ataggaatta	agggtgttcc	ccccccccc	aacctcttcc	tcagaccag	13440
ccactttcta	tgacttataa	acatccaggt	aaaaattaca	aacataaaaa	tggtttctct	13500
tctcaatctt	ctaaagtctg	cctgcctttt	ccaggggtag	gtctgtttct	ttgctgttct	13560
attgtcttga	gagcacagac	taacacttac	caaatgaggg	aactcttggc	ccatactaag	13620
gctcttctgg	gctccagcac	tcttaagtta	ttttaagaat	tctcacttgg	ccttttagcac	13680
acccgccacc	cccaagtggg	tgtggataat	gccatggcca	gcagggggca	ctggtgaggc	13740
gggtgccttt	ccaccttaag	ttgcttatag	tatttaagat	gctaaatggt	ttaatcaaga	13800
gaagcactga	tcttataata	cgaggataag	agattttctc	acaggaaatt	gtctttttca	13860
taattctttt	acaggctttg	tcctgatcgt	agcatagaga	gaatagctgg	atatttaact	13920
tgtattccat	tttctctg	cagcgttagg	ttaactccgt	aaaaagtgat	tcagtggacc	13980
gaagaggctc	agagggcagg	ggatggtggg	gtgaggcaga	gcactgtcac	ctgccaggca	14040
tgggaggtcc	tgccatccgg	gaggaaaagg	aaagttagc	ctctagtcta	ccaccagtgt	14100
taacgcactc	taaagtgtga	accaaataa	atgtcttaca	ttacaaagac	gtctgttttg	14160
tgtttccttt	tgtgtgtttg	ggctttttat	gtgtgcttta	taactgctgt	ggtgggtgctg	14220
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
gtggctccag	gtccagagga	tccaggacct	ctggcctcca	tgggcatctg	ctcttagcac	14520
ataccacat	acagatacac	acataaaaaat	aaaatgaagc	ctttaaaaac	ctcctaaaac	14580
ctagcccttg	gaggtacgac	tctggaaagc	tggcatactg	tgtaagtcca	tctcatggtg	14640
ttctggctaa	cgtaagactt	acagagacag	aaaagaactc	agggtgtgct	gggggttggg	14700
atggaggaag	agggatgagt	agggggagca	cggggaactt	gggcagtgaa	aattctttgc	14760
aggacactaq	aqagagataa	arandagtra	ttgcacccac	tactggâcaa	ctccâyyâa	14820
ttatgctggg	tgaaaagaga	aggccccagg	tattggctgc	attggctgca	tttgcgtaac	14880
atttttttta	attgaaaaga	aaaagatgta	aatcaagggt	agatgagtgg	ttgctgtgag	14940
ctgagagctg	gggtgagtga	gacatgtgga	caactccatc	aaaaagcgac	agaaagaacg	15000
ggctgtggtg	acagctacct	ctaactcca	cctccgggag	gtgatcaagg	ttagccctca	15060
gctagcctgt	ggtgcatgag	accctgtttc	aaaaacttta	ataaagaaat	aatgaaaaaa	15120

ES 2 272 093 T5

gacatcaggg cagatccttg gggccaaagg cggacaggcg agtctcgtgg taaggtcgtg 15180
tagaagcgga tgcattgagca cgtgcccgag gcatcatgag agagccctag gtaagtaagg 15240
atggatgtga gtgtgtcggc gtcggcgcac tgcacgtcct ggctgtggtg ctggactggc 15300
atctttggtg agctgtggag gggaaatggg tagggagatc ataaaatccc tccgaattat 15360
ttcaagaact gtctattaca attatctcaa aatattaaaa aaaaagaaga attaaaaaac 15420
aaaaaaccta tccaggtgtg gtggtgtgca cctatagcca cgggcacttg gaaagctgga 15480
gcaagaggat ggcgagtttg aaggtatctg gggctgtaca gcaagaccgt cgtcccaaaa 15540
ccaaacccaa cagcaaaccc attatgtcac acaagagtgt ttatagttag cggcctcgtc 15600
gagagcatgg ggtgggggtg ggggtggggg acagaaatat ctaaaactgca gtcaataggg 15660
atccactgag accctggggc ttgactgcag cttaaccttg ggaaatgata agggttttgt 15720
gttgagtaaa agcatcgatt actgacttaa cctcaaataga agaaaaagaa aaaaagaaaa 15780
caacaaaagc caaaccaagg ggctggtgag atggctcagt gggtaagagc acccgactgc 15840
tcttccgaag gtccagagtt caaatcccag caaccacatg gtggctcaca accatctgta 15900
acgagatatg atgccctctt ctggtgtgtc tgaagacagc tacagtgtac ttacatataa 15960
taaataaatc ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagccaaa ccgagcaaac caggccccc 16020
aacagaaggc aggcacgacg gcagggacca cgagccatcc tgtgaaaagg cagggctacc 16080
catgggcccga ggaggggtcca gagagatagg ctggtaagct cagtttctct gtataccctt 16140
tttcttggtg aactacttc aattacagat aaaataacaa ataaacaaaa tctagagcct 16200
ggccactctc tgctcgcttg atttttcctg ttacgtccag caggtggcgg aagtgttcca 16260
aggacagatc gcatcattaa ggtggccagc ataatctccc atcagcaggt ggtgctgtga 16320
gaaccattat ggtgctcaca gaatcccggg cccaggagct gccctctccc aagtctggag 16380
caataggaaa gctttctggc ccagacaggg ttaacagtcc acattccaga gcaggggaaa 16440
aggagactgg aggtcacaga caaaagggcc agcttctaac aacttcacag ctctggtagg 16500
agagatagat caccaccaac aatggccaca gctggttttg tctgccccga aggaaactga 16560
cttaggaagc aggtatcaga gtccccctcc tgaggggact tctgtctgcc ttgtaaagct 16620
gtcagagcag ctgcatatgat gtgtgggtga cagaagatga aaaggaggac ccaggcagat 16680
cgccacagat ggaccggcca cttacaagtc gaggcaggtg gcagagcctt gcagaagctc 16740
tgcaggtgga cgacactgat tcattacca gttagcatc cacagcgggc taggcggacc 16800
acagcctcct tcccagctct cctccagggc tggggagtcc tccaaccttc tgtctcagtg 16860
cagcttccgc cagccctcc tcttttgca cctcaggtgt gaaccctccc tctctcctt 16920
ctccctgtgg catggccctc ctgctaactg aggctgagca ttggatttct ttgtgcttag 16980
atagacctga gatggctttc tgatttatat atatatatcc atcccttggg tcttacatct 17040
aggaccaga gctgtttgtg ataccataag aggctgggga gatgatatgg taagagtgtc 17100
tgctgtacaa gcatgaagac atgagttcga atccccagca accatgtgga aaaataacct 17160
tctaacctca gagttgaggg gaaaggcagg tggattctgg gggcttactg gccagctagc 17220
cagcctaacc taaatgtctc agtcagagat cctgtctcag ggaataactt gggagaatga 17280

ES 2 272 093 T5

ctgagaaaga	cacctcctca	ggtctcccat	gcacccacac	agacacacgg	gggggggta	17340
atgtaataag	ctaagaaata	atgagggaaa	tgattttttg	ctaagaaatg	aaattctgtg	17400
ttggccgcaa	gaagcctggc	cagggaaagga	actgcctttg	gcacaccagc	ctataagtca	17460
ccatgagttc	cctggctaag	aatcacatgt	aatggagccc	aggtccctct	tgcttggtgg	17520
ttgcctctcc	cactggtttt	gaagagaaat	tcaagagaga	tctccttggg	cagaattgta	17580
ggtgctgagc	aatgtggagc	tggggtaaat	gggattcctt	taaaggcatc	cttcccaggg	17640
ctgggtcata	cttcaatagt	aggggtgctt	cacagcaagc	gtgagaccct	aggttagagt	17700
ccccagaatc	tgcccccaac	ccccaaaaa	ggcatccttc	tgctctggg	tgggtggggg	17760
gagcaaacac	ctttaactaa	gaccattagc	tggcaggggt	aacaaatgac	cttggctaga	17820
ggaatttggg	caagctggat	tccgccttct	gtagaagccc	cacttggttc	ctttgtaag	17880
ctggcccaca	gtttgttttg	agaatgcctg	aggggcccag	ggagccagac	aattaaagc	17940
caagctcatt	ttgatatctg	aaaaccacag	cctgactgcc	ctgcccgtgg	gaggtactgg	18000
gagagctggc	tgtgtccctg	cctcaccaac	gcccccccc	ccaacacaca	ctcctcggtt	18060
cacctgggag	gtgccagcag	caatttggaa	gtttactgag	cttgagaagt	cttgggaggg	18120
ctgacgctaa	gcacaccctt	tctccacccc	ccccacccc	acccccgtga	ggaggagggg	18180
gaggaaacat	gggaccagcc	ctgctccagc	ccgtccttat	tggctggcat	gaggcagagg	18240
gggctttaa	aaggcaaccg	tatctaggct	ggacactgga	gcctgtgcta	ccgagtgcc	18300
tctccacct	ggcagcatgc	agccctcact	agccccgtgc	ctcatctgcc	tacttgtgca	18360
cgctgccttc	tgtgctgtgg	agggccaggg	gtggcaagcc	ttcaggaatg	atgccacaga	18420
ggtcatccca	gggcttggag	agtaccccg	gcctcctcct	gagaacaacc	agaccatgaa	18480
ccgggcgagg	aatggaggca	gacctcccca	ccatccctat	gacgccaag	gtacgggatg	18540
aagaagcaca	ttagtggggg	ggggggtcct	gggaggtgac	tgggggtggt	ttagcatcct	18600
cttcagaggt	ttgtgtgggt	ggctagcctc	tgtacatca	gggcagggac	acatttgcct	18660
ggaagaatac	tagcacagca	ttagaacctg	gagggcagca	ttggggggct	ggtagagagc	18720
acccaaggca	gggtggaggc	tgaggtcagc	cgaagctggc	attaacacgg	gcatgggctt	18780
gtatgatggt	ccagagaatc	tctcctaag	gatgaggaca	caggtcagat	ctagctgctg	18840
accagtgggg	aagtgatatg	gtgaggctgg	atgccagatg	ccatccatgg	ctgtactata	18900
tcccacatga	ccaccacatg	aggtaaagaa	ggccccagct	tgaagatgga	gaaaccgaga	18960
ggctcctgag	ataaagtcac	ctgggagtaa	gaagagctga	gactggaagc	tggtttgatc	19020
cagatgcaag	gcaaccctag	attgggtttg	ggtgggaacc	tgaagccagg	aggaatccct	19080
ttagttcccc	cttggccagg	gtctgctcaa	tggcccaga	gggttagcat	taaaagaaca	19140
gggtttgtag	gtggcatgtg	acatgagggg	cagctgagtg	aaatgtcccc	tgtatgagca	19200
caggtggcac	cacttgccct	gagcttgcac	cctgacccca	gctttgcctc	attcctgagg	19260
acagcagaaa	ctgtggaggc	agagccagca	cagagagatg	cctgggggtg	gggtgggggt	19320
atcacgcacg	gaactagcag	caatgaatgg	ggtgggggtg	cagctggagg	gacactccag	19380
agaaatgacc	ttgetgggtca	ccatttgtgt	gggaggagag	ctcattttcc	agcttgccac	19440

ES 2 272 093 T5

cacatgctgt ccctcctgtc tcctagccag taagggatgt ggaggaaagg gccaccccaa 19500
aggagcatgc aatgcagtca cgtttttgca gaggaagtgc ttgacctaaag ggcaactatc 19560
ttggaaagcc ccaaaaactag tccttccctg ggcaaacagg cctccccac ataccacctc 19620
tgcaggggtg agtaaattaa gccagccaca gaaggggtggc aaggcctaca cctccccct 19680
gttgtgcccc ccccccccc gtgaaggtgc atcctggcct ctgcccctct ggctttggta 19740
ctgggatttt ttttttctt ttatgtcata ttgacctga caccatggaa cttttggagg 19800
tagacaggac ccacacatgg attagttaa agcctcccat ccatctaagc tcatggtagg 19860
agatagagca tgcccaagag aggagggcag gcatcagacc tagaagatat ggctgggcat 19920
ccaacccaat ctcttcccc ggagaacaga ctctaagtca gatccagcca cccttgagta 19980
accagctcaa ggtacacaga acaagagagt ctggtataca gcaggtgcta aacaaatgct 20040
tgtggtagca aaagctatag gttttgggtc agaactccga cccaagtgc gagtgaagag 20100
cgaaggccc tctactcgc accgccccgc cccacctgg ggtcctataa cagatcactt 20160
tcacccttgc gggagccaga gagccctggc atcctaggta gcccccccg ccccccccc 20220
gcaagcagcc cagccctgcc tttggggcaa gttctttct cagcctggac ctgtgataat 20280
gaggggggtg gacgcgccgc ctttgggtgc tttcaagtct aatgaattct tatccctacc 20340
acctgccctt ctaccccgct cctccacagc agctgtcctg atttattacc ttcaattaac 20400
ctccactcct ttctccatct cctgggatac cgcccctgtc ccagtggctg gtaaaggagc 20460
ttaggaagga ccagagccag gtgtggctag aggctaccag gcagggctgg ggatgaggag 20520
ctaaactgga agagtgtttg gttagtaggc acaaagcctt ggggtgggac cctagtaccg 20580
gagaagtgga gatgggcgct gagaagttca agaccatcca tccttaacta cacagccagt 20640
ttgaggccag cctgggctac ataaaaacc aatctcaaaa gctgccaatt ctgattctgt 20700
gccacgtagt gcccgatgta atagtggatg aagtcgttga atcctggggc aacctattt 20760
acagatgtgg ggaaaagcaa ctttaagtac cctgccaca gatcaciaaag aaagtaagtg 20820
acagagctcc agtgtttcat ccctgggttc caaggacag gagagagaag ccaggggtggg 20880
atctcactgc tccccggtgc ctcttctcta taatccatac agattcgaaa gcgcagggca 20940
ggtttggaaa aagagagaag ggtggaagga gcagaccagt ctggcctagg ctgcagcccc 21000
tcacgcatcc ctctctccgc agatgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc 21060
cgcttctga cagacggccc atgccgcagc gccaaagccgg tcaccgagtt ggtgtgctcc 21120
ggccagtgcg gccccgcgcg gctgctgccc aacgccatcg ggcgcgtgaa gtgggtggcgc 21180
ccgaacggac cggatttccg ctgcatcccg gategctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg 21240
ctgtgccccg ggggcgcggc gccgcgctcg cgcaaggtgc gtctgggtggc ctctgtcaag 21300
tgcaagcgc tcaccgctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg gccggagacc 21360
gcgcggccgc agaagggctc caagccgcgg cccggcgcgc ggggagccaa agccaaccag 21420
gcggagctgg agaacgccta ctagagcgag cccgcgccta tgcagcccc gcgcgatccg 21480
attcgttttc agtgtaaagc ctgcagccca ggccaggggt gccaaaacttt ccagaccgtg 21540
tggagtccc agcccagtag agaccgcagg tccttctgcc cgctgcgggg gatggggagg 21600

ES 2 272 093 T5

ggggtggggtt cccgcggggcc aggagaggaa gcttgagtcc cagactctgc ctagccccgg 21660
 gtgggatggg ggtctttcta ccctcgccgg acctatacag gacaaggcag tgtttccacc 21720
 ttaaaggga gggagtgtgg aacgaaagac ctgggactgg ttatggacgt acagtaagat 21780
 ctactccttc cacccaaatg taaagcctgc gtgggctaga tagggtttct gaccctgacc 21840
 tggccactga gtgtgatgtt gggctacgtg gttctctttt ggtacggtct tctttgtaaa 21900
 atagggaccg gaactctgct gagattccaa ggattggggg accccgtgta gactggtgag 21960
 agagaggaga acagggggagg ggttagggga gagattgtgg tgggcaaccg cctagaagaa 22020
 gctgtttgtt ggctcccagc ctcgccgcct cagaggtttg gcttccccca ctcttcctc 22080
 tcaaactctgc cttcaaatcc atatctggga tagggaaggc cagggtccga gagatggtgg 22140
 aagggccaga aatcacactc ctggcccccc gaagagcagt gtcccccccc caactgcctt 22200
 gtcataattgt aaagggattt tctacacaac agtttaaggt cgttggagga aactgggctt 22260
 gccagtcacc tcccatcctt gtcccttgcc aggacaccac ctctgcctg ccaccacgg 22320
 acacatctct gtctagaaac agagcgtcgt cgtgctgtcc tctgagacag catatcttac 22380
 attaaaaaga ataatacggg gggggggggc ggagggcgca agtgttatac atatgctgag 22440
 aagctgtcag gcgccacagc accaccaca atctttttgt aaatcatttc cagacacctc 22500
 ttactttctg tgtagatttt aattgttaaa aggggaggag agagagcgtt tgtaacagaa 22560
 gcacatggag gggggggtag ggggggtggg gctggtagt ttggcgaact ttccatgtga 22620
 gactcatcca caaagactga aagccgcgtt tttttttta agagttcagt gacatattta 22680
 ttttctcatt taagttattt atgccaacat tttttcttg tagagaaagg cagtgttaat 22740
 atcgctttgt gaagcacaag tgtgtgtggt tttttgtttt ttgttttttc cccgaccaga 22800
 ggcattgtta ataaagacaa tgaatctcga gcaggaggct gtggctctgt tttgtcaacc 22860
 acacacaatg tctcgccact gtcactctac tcccttcctt tggtcacaag acccaaacct 22920
 tgacaacacc tccgactgct ctctggtagc ccttgtggca atacgtgttt cctttgaaa 22980
 gtcacattca tcccttcctt tgcaaacctg gctctcattc cccagctggg tcatcgtcat 23040
 accctcacc cagcctccct ttagctgacc actctccaca ctgtctcca aaagtgcag 23100
 tttcaccgag ccagttccct ggtccaggtc atcccattgc tccctctgct tccagaccct 23160
 tctcccacaa agatgttcat ctcccactcc atcaagcccc agtggccctg cggctatccc 23220
 tgtctcttca gttagctgaa tctacttgct gacaccacat gaattccttc cctgtctta 23280
 aggttcatgg aactcttgcc tgccccctgaa ccttccagga ctgtcccagc gtctgatgtg 23340
 tctctctct tgtaaagccc caccacctta tttgattccc aattctagat ctcccttgt 23400
 tcaattcctc acgggaragt gtctcatctg gccaaagtcc gcttgataat yyyataaatg 23460
 caaagccaag tacaattgag gaccagttca tcattgggcc aagctttttc aaaatgtgaa 23520
 ttttacacct atagaagtgt aaaagcctc caaagcagag gcaatgcctg gctcttcctt 23580
 caacatcagg gctcctgctt tatgggtctg gtggggtagt acattcataa acccaacact 23640
 aggggtgtga aagcaagatg attgggagt cgaggccaat ctggctatg aggcctgtc 23700
 tcaacctctc ctccctccct ccagggtttt gttttgtttt gtttttttga tttgaaactg 23760

ES 2 272 093 T5

caacacttta aatccagtca agtgcattct tgcgtgaggg gaactctatc cctaataataa 23820
 gcttccatct tgatttgtgt atgtgcacac tgggggttga acctgggctt ttgtacctgc 23880
 cgggcaagct ctctactgct ctaaaccag ccctcactgg ctttctgttt caactcccaa 23940
 tgaattcccc taaatgaatt atcaatatca tgtctttgaa aaataccatt gagtgctgct 24000
 ggtgtccctg tggttccaga ttccaggaag gacttttcag ggaatccagg catcctgaag 24060
 aatgtcttag agcaggaggc catggagacc ttggccagcc ccacaaggca gtgtggtgca 24120
 gagggtgagg atggaggcag gcttgcaatt gaagctgaga cagggtactc aggattaaaa 24180
 agcttcccc aaaacaattc caagatcagt tcctggact tgcacctgtt cagctatgca 24240
 gagcccagtg ggcataagtg aagacaccgg ttgtactgtc atgtactaac tgtgcttcag 24300
 agccggcaga gacaaataat gttatggtga cccagggga cagtattcc agaaggaaca 24360
 cagaagagag tgctgctaga ggctgcctga aggagaaggg gtcccagact ctctaagcaa 24420
 agactccact cacataaaga cacaggctga gcagagctgg ccgtggatgc agggagccca 24480
 tccaccatcc tttagcatgc ccttgtattc ccatcacatg ccagggatga ggggcatcag 24540
 agagtccaag tgatgccccaa acccaaacac acctaggact tgctttctgg gacagacaga 24600
 tgcaggagag actaggttgg gctgtgatcc cattaccaca aagagggaaa aaacaaaaaa 24660
 caaacaaca aacaaaaaaa aacaaaaca aacaaaaaa aaccaaggt ccaattgta 24720
 ggtcaggtta gagtttattt atggaaagt atattctacc tccatgggtt ctacaaggct 24780
 ggcgcccac agaaagaaca aacaacaggc tgatctggga ggggtggtac tctatggcag 24840
 ggagcacgtg tgcttggggg acagccagac acggggcttg tattaatcac agggcttcta 24900
 ttaataggct gagagtcaag cagacagaga gacagaagga aacacacaca cacacacaca 24960
 cacacacaca cacacacaca catgcacaca cactcactt ctactcgaag gagcccctac 25020
 ttacattcta agaacaacc attcctctc ataaaggaga caaagttgca gaaacccaaa 25080
 agagccacag ggtccccact ctctttgaaa tgacttggac ttgttgcagg gaagacagag 25140
 gggctctgag aggttctctg ggtgaccag agccacagac actgaaatct ggtgctgaga 25200
 cctgtataaa cctcttcca caggttccct gaaaggagcc cacattcccc aacctgtct 25260
 cctgaccact gaggatgaga gcacttgggc cttccccatt cttggagtgc acctgggtt 25320
 ccccatctga gggcacatga ggtctcaggt cttgggaaag ttccacaagt attgaaagtg 25380
 ttcttgttt gtttgtgatt taatttaggt gtatgagtgc ttttgcttga atatatgcct 25440
 gtgtagcatt tacāagcctg gtgcctgagg agatcagaag atggcatcag ataccctgga 25500
 actggacttg cagacagtta tgagccactg tgtgggtgct aggaacagaa cctggatcct 25560
 ccggaagagc agacagccag cgctcttagc cactaagcca tctactgaggt tctttctgtg 25620
 gctaaagaga caggagacaa aggagagttt cttttagtca ataggaccat gaatgttct 25680
 cgtaacgtga gactagggca ggggatccc ccagtgcac cgatggccct gtgtagttat 25740
 tagcagctct agtcttattc cttataagt cccagtttg ggcaggagat atgtattccc 25800
 tgctttgaag tggctgaggt ccagttatct actccaagt acttgtttct ctttctggag 25860
 ttggggaagc tcctgcctg cctgtaaagt tgtccattct tcaaccttag acaagatcac 25920

ES 2 272 093 T5

tttcctgag	cagtcaggcc	agtcxaaagc	ccttcaattt	agctttcata	aggaacaccc	25980
cttttgttg	gtggaggtag	cacttgcctt	gaatcccagc	attaagaagg	cagagacagt	26040
cggatctctg	tgagttcaca	gccagcctgg	tctacggagt	gagttccaag	acagccaggc	26100
ctacacagag	aaacctgtc	tcgaaaaaaa	caaaaacaaa	agaaataaag	aaaaagaaaa	26160
caaaaacgaa	caaacagaaa	aacaagccag	agtgtttgtc	cccgtatfff	attaatcata	26220
tttttgtccc	tttgcattt	tagactaaaa	gactcgggaa	agcaggctcc	tctctgtttc	26280
tcacccggac	acaccagaa	ccagatgtat	ggaagatggc	taatgtgctg	cagttgcaca	26340
tctggggctg	ggtggattgg	ttagatggca	tgggctgggt	gtggttacga	tgactgcagg	26400
agcaaggagt	atgtggtgca	tagcaaacga	ggaagtttgc	acagaacaac	actgtgtgta	26460
ctgatgtgea	ggtatgggca	catgcaagca	gaagccaagg	gacagcctta	gggtagtgtt	26520
tccacagacc	cctccccctt	tttaacatgg	gcatctctca	ttggcctgga	gcttgccaac	26580
tgggctgggc	tggctagctt	gtaggtccca	gggatctgca	tatctctgcc	tccctagtgc	26640
tgggattaca	gtcatatatg	agcacacctg	gcttttttat	gtgggttctg	ggctttgaac	26700
ccagatctga	gtgcttgcaa	ggcaatcggg	tgaatgactg	cttcatctcc	ccagaccctg	26760
ggattctact	ttctattaaa	gtatttctat	taaatcaatg	agcccctgcc	cctgcactca	26820
gcagttctta	ggcctgctga	gagtcaagtg	gggagtgaga	gcaagcctcg	agaccccatc	26880
agcgaagcag	aggacaaaga	aatgaaaact	tgggattcga	ggctcgggat	atggagatac	26940
agaaagggtc	aggaagggaa	atgaaccaga	tgaatagagg	caggaagggt	agggccctgc	27000
atacatggaa	cctggtgtac	atgttatctg	catggggttt	gcattgcaat	ggctcttcag	27060
caggttcacc	acactgggaa	acagaagcca	aaaagaagag	taggtgggtg	tggagtccga	27120
tactgtcagt	catgcctgaa	gaaatggaag	caattaacga	tgcgccgcaa	ttaggatatt	27180
agctccctga	agaaaggcaa	gaagctgggc	tgtgggcact	gaagggagct	ttgaatgatg	27240
tcacattctc	tgtatgccta	gcagggcagt	attggagact	gagacttgac	ttgtgtgtcc	27300
atatgattcc	tccttttctt	acagtcatct	ggggctcctg	agcttcgtcc	ttgtccaaga	27360
acctggagct	ggcagtgggc	agctgcagtg	atagatgtct	gcaagaaaga	tctgaaaaga	27420
gggaggaaga	tgaaggacct	agaggaccac	cgacctctgc	tgcttgacaa	agctgcagga	27480
ccagtctctc	ctacagatgg	gagacagagg	cgagagatga	atggtcaggg	gaggagtccg	27540
agaaaggaga	gggtgaggca	gagaccaaag	gagggaaaca	cttgtgctct	acagctactg	27600
actgagtacc	agctgcgtgg	cagacagcca	atgccaaagg	tcggctgac	atggcacctc	27660
gtgggactcc	tagccagtg	ctggeagagg	ggagtgtgca	atggtgcatg	gtttggatat	27720
gatctgaatg	tqqtccaqcc	ctagtttctt	tccagtgtgt	gggataaagc	accctgacca	27780
aagctacttt	tttgtttggt	tgttttggtt	tggttttggt	tggtttttctg	aggcaggggt	27840
tctctgtatc	accctagctg	tcttgaact	cactctgtag	accaggctgg	cctcgaactc	27900
agaaatcccc	ctgcctctgc	ctcctaagtg	ctggaattaa	aggcctgcgc	caaccactgcc	27960
ggcccaaagc	tactttaaga	gagagagagg	aatgtataag	tattataatt	ccaggttata	28020
gttcattgct	gtagaattgg	agtcttcata	ttccaggtaa	tctcccacag	acatgccaca	28080

ES 2 272 093 T5

aaacaacctg ttctacgaaa tctctcatgg actcccttcc ccagtaattc taaactgtgt 28140
 caaatctaca agaaatagtg acagtcacag tctctaacgt tttgggcatg agtctgaagt 28200
 ctcatgcta agtactggga agatgaaaac tttacctagt gtcagcatth ggagcagagc 28260
 ctttgggatt tgagatggtc ttttgcaagc ctccctaatgg ctacatggag agagggggcc 28320
 tgggagagac ccatacacct tttgctgcct tatgtcacct gacctgctcc ttgggaagct 28380
 cttagcaagaa ggccttccct ggatcaccca ccaccttgca cctccagaac tcagagccaa 28440
 attaaacttt cttgttactg tcgtcaaagc acagtcggtc tgggttgtat cactgtcaat 28500
 gggaaacaga cttgcctgga tggataactt gtacattgca taatgtctag aaatgaaaag 28560
 tcctatagag aaaaagaaaa ttagctggca cacagataga ggcctggag gaggctggct 28620
 ttgtcctccc cgaggaggtg gcgagtaagg tgtaaagt catggatgta aatgggccc 28680
 tatatgaggg tctggggtaa caagaaggcc tgtgaatata aagcactgaa ggtatgtcta 28740
 gtctggagaa ggtcactaca gagagtctc caactcagtg ccatacaca cacacacaca 28800
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca ccacaaagaa aaaaaggaag aaaaatctga 28860
 gagcaagtac agtacttaaa attgtgtgat tgtgtgtgtg actctgatgt cacatgtctca 28920
 tcttgcctca tgagttgaaa accaaatggc cctgagagg cataacaacc acactgttgg 28980
 ctgtgtgctc acgtttttct taaagcgtct gtctggtttg ctgctagcat caggcagact 29040
 tgcagcagac tacatatgct cagccctgaa gtccttctag ggtgcatgtc tcttcagaat 29100
 ttcagaaagt catctgtggc tccaggaccg cctgcactct ccctctgccg cgaggctgca 29160
 gactctaggc tggggtgga gcaacgctta cctctgggac aagtataaca tgttggcttt 29220
 tctttccctc tgtggctcca acctggacat aaaatagatg caagctgtgt aataaatatt 29280
 tcctcccgtc cacttagttc tcaacaataa ctactctgag agcacttatt aataggtggc 29340
 ttagacataa gctttggctc attccccac tagctcttac ttctttaaact ctttcaaacc 29400
 attctgtgtc ttccacatgg ttagttacct ctccctccat cctggttcgc ttcttcttc 29460
 gagtcgccct cagtgtctct aggtgatgct tgtaagatat tctttctaca aagctgagag 29520
 tggtaggact ctgggagttc aaagccagcc tgatctacac agcaagctcc aggatatcca 29580
 gggcaatgtt gggaaaacct ttctcaaaca aaaagagggg ttcagttgtc aggaggagac 29640
 ccatgggtta agaagtctag acgagccatg gtgatgcata cctttcatcc aagcacttag 29700
 gaggcaaaga aagggtgaaac tctttgactt tgaggccagc taggttacat agtgataccc 29760
 tgcttagtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgttaatt taaaagtcta 29820
 aaaatgcatt cttttaaaaa tatgtataag tatttgcctg cacatatgta tgtatgtatg 29880
 tataccatgt gtgtgtctgg tgctgaagga ctaggcatag actccctaga actagagtca 29940
 tagacagttg tgacactccc caacccccca ccatgtgggt gcttgaagct aaactcctgt 30000
 cttttgtaaa gcagcaggtg tctatgaacc ctgaaccatc tctccagtct ccagatgtgc 30060
 attctcaaag aggagtcctt catatttccc taaactgaac atccttatca gtgagcatcc 30120
 tcgagtcacc aaagctactg caaacctct tagggaacat tcaactattca cttctacttg 30180
 gctcatgaaa cttaagtaca cacacacaaa cacacacaca cacacagagt catgcactca 30240

ES 2 272 093 T5

caaaagcatg	catgtacacc	attcttatta	gactatgctt	tgctaaaaga	ctttcctaga	30300
tactttaaaa	catcacttct	gccttttggg	gggcagggtc	caagattggg	actggcgtac	30360
tggaaactga	acaaggtaga	gatctagaaa	tcacagcagg	tcagaagggc	cagcctgtac	30420
aagagagagt	tccacacctt	ccaggaacac	tgagcagggg	gctgggacct	tcctctcag	30480
cccaagaaac	tagtgcgttt	cctgtatgca	tgctctcag	agattccata	agatctgcct	30540
tctgccataa	gatctcctgc	atccagacaa	gcctagggga	agttgagagg	ctgcctgagt	30600
ctctcccaca	ggccccttct	tgctggcag	tattttttta	tctggaggag	aggaatcagg	30660
gtgggaatga	tcaaatataa	ttatcaagga	aaaagtaaaa	aacatatata	tatatatatt	30720
aactgatcta	gggagctggc	tcagcagtta	agagttctgg	ctgcccttgc	ttcagatctt	30780
gctttgattc	ccagcaccca	catgatggct	ttcaactgta	tctctgcttc	caggggatcc	30840
aacagcctct	tctgacctcc	atagacaaga	cctagtcctc	tgcaagagca	ccaatgctc	30900
ttatctgttg	atccatctct	ctagcctcat	gccagatcat	ttaaaactac	tggacactgt	30960
cccattttac	gaagatgtca	ctgcccagtc	atctgccatg	agtggatatt	tcgattcttt	31020
ctatgttctc	acccttgcaa	tttataagaa	agatatctgc	atctgtctcc	tgagagaaca	31080
aagggtgagg	ggctactgag	atggctctag	gggtaaaggt	gcttgccaca	aaatctgaca	31140
acttaagttt	ggtcttgtaa	tccacatggt	ggagagagag	aagagattcc	cgtaagttgt	31200
cctcaaaact	cccacacatg	tgctgtggct	tatgtgtaac	cccaataagt	aaagatagtt	31260
ttaaactacta	cataaggtag	ggtttcttca	tgaccccaag	gaatgatgcc	cctgatagag	31320
cttatgctga	aaccccatct	ccattgtgcc	atctggaaag	agacaattgc	atcccggaaa	31380
cagaatcttc	atgaatggat	taatgagcta	ttaagaaagt	ggcttggtta	ttgcacatgc	31440
tggcggcgta	atgacctcca	ccatgatggt	atccagcatg	aaggtcctca	ccagaagtca	31500
tacaaatctt	cttaggcttc	cagagtcgtg	agcaaaaaaa	gcacacctct	aaataaatta	31560
actagcctca	ggtagttaac	caccgaaaat	gaaccaaggc	agttctaata	caaaaccact	31620
tcccttcctt	gttcaaacca	cagtgcccta	ttatctaaaa	gataaacttc	aagccaagct	31680
tttaggttgc	cagtatttat	gtaacaacaa	ggcccgttga	cacacatctg	taactcctag	31740
tactgggcct	caggggcaga	gacaggtgga	gccctggagt	ttgaattcca	ggttctgtga	31800
gaaactctgt	ctgaaaagac	aatatggtga	gtgacccggg	aggatatctg	atattgactt	31860
ctggccaaca	cacagccatc	tctgcacatc	tgtagttgca	agccttttgc	actaagtttg	31920
gccagagtca	gagtttgcaa	gtgtttgtgg	actgaatgca	cgtgttgctg	gtgatctaca	31980
aagtcacctt	ccttctcaag	ctagcagcac	tggcttcggc	cagctgctca	ttcaagcctc	32040
tttgcagagt	catcacgggg	atgggggagc	agggcccttc	cctagaaccac	caagcctgtg	32100
gttgtttatt	caggacatta	ttgagggcca	agatgacaga	taactctatc	acttgggcaa	32160
cagtgggttg	ttgcgggtgt	aggttatctc	tgtgtctgca	gaaaacagtg	caacctggac	32220
aaaagaaata	aatgatatca	tttttcattc	aggcaactag	attccgtggg	acaaaaggct	32280
ccctggggaa	cgaggccggg	acagcgcggc	tcttgagtcg	ctatttccgt	ctgtcaactt	32340
ctctaactct	ttgatttctt	ccctctgtct	gtttccttcc	tcttgctggg	gccagtgga	32400

ES 2 272 093 T5

gtctgtgtac tcacagggag gaggggtggca aagccctggg cctctacggg ctgggggaag 32460
 gggggaagct gtcggcccag tgactttttc ccctttctct ttttcttaga aaccagtctc 32520
 aatttaagat aatgagtctc ctcatctcac tgtgctcact attcataggg acttatccac 32580
 ccccgccctg tcaatctggc taagtaagac aagtcaaatt taaaagggaa cgtttttcta 32640
 aaaatgtggc tggaccgtgt gccggcacga aaccagggat ggcgggtctaa gttacatgct 32700
 ctctgccagc cccggtgcct tttcctttcg gaaaggagac ccggaggtaa aacgaagtgt 32760
 ccaacttttg atgatgggtg gcgccgggtg actctttaa atgtcatcca tacctgggat 32820
 agggaaggct cttcagggag tcatctagcc ctccctcag gaaaagattc cacttccggg 32880
 ttagttagct tccacctggg cccttatccg ctgtctctgc ccactagtcc tcatccatcc 32940
 ggtttccgcc ctcatccacc ttgccctttt agttcctaga aagcagcacc gtagtcttgg 33000
 cagggtggcc attggtcact ccgctaccac tgttaccatg gccaccaagg tgtcatttaa 33060
 atatgagctc actgagtcct gcgggatggc ttggttggta atatgcttgc tgcaaaatcg 33120
 tgagaactgg agttcaatc ccagcacatg gatgtatttc cagcacctgg aaggcagggg 33180
 gcagagatct taaagctcct ggccagacag cccagcctaa ttagtaatca gtgagagacc 33240
 ctgtctcaag aaacaagatg gaacatcaaa ggtcaacctc ttgtctccac acacacaaat 33300
 acacacatgc acatacatcc acacacaggc aaacacatgc acacacctga acaccctcca 33360
 caaatacata cataaaaaaa taaatacata cacacataca tacatacacc aacattccct 33420
 ctcttagtc tcttggttac gctcttgtca cccccactaa ggcttcaact tcttctattt 33480
 cttcatcttg actcctctgt actttgcatg ccttttcag caaaggcttt tctttaaact 33540
 tccgtcattc ataaactccc tctaaatttc tcccctgcc cttttcttcc tctctagggg 33600
 gataaagaca cacactacaa agtcaccgtg ggaccagttt attcaccac ccaccctgc 33660
 ttctgttcat ccggccagct aagtagtcca acctctctgg tgctgtacc tggaccctgg 33720
 cttcaccaca gtcctccat gctaccagc cctgcaaacc ttcagcctag cctctggttc 33780
 tccaaccagc acaggcccag tctggcttct atgtcctaga aatctcctc attctctcca 33840
 tttccctcct gaatctacca ccttctttct cccttctcct gacctctaat gtcttgggtca 33900
 aacgattaca aggaagccaa tgaaattagc agtttggggg acctcagagt cagcagggga 33960
 gctgggatga attcacattt ccaggccttt gctttgctcc ccggattctg acaggcagtt 34020
 ccgaagctga gtccaggaag ctgaatttaa aatcacactc cagctggggt ctgaggcagc 34080
 cctaccacat cagctggccc tgactgagct gtgtctgggt ggcagtggtg ctgggtggtg 34140
 tgggtggtgct ggtgggtggt gtgggtggtg tgggtggtggt ggtgggtggt tgtgtgtgtg 34200
 ttttctgctt ttacaaaact tttctaattc ttatacaaag gacaaatctg cctcatatag 34260
 gcagaaagat gacttatgcc tatataagat ataaagatga ctttatgcca cttattagca 34320
 atagtactg tcaaaagtaa ttctatttat acacccttat acatgggtatt gcttttgttg 34380
 gagactctaa aatccagatt atgtatttaa aaaaaattc ccagtcctt aaaagggtgaa 34440
 gaatggacc agatagaagg tcacggcaca agtatggagt cggagtgtgg agtcctgcc 34500
 atggtctgga cagaagcatc cagagagggg ccaagacaaa tgctctgcct cctaaggaac 34560

ES 2 272 093 T5

actggcagcc ctgatgaggt accagagatt gctaagtgga ggaatacagg atcagaccca 34620
 tggaggggct taaagcgtga ctgtagcagc cctccgctga ggggctccag gtgggcgccc 34680
 aaggtgctgc agtgggagcc acatgagagg tgatgtcttg gagtcacctc ggggtaccatt 34740
 gtttagggag gtggggattt gtggtgtgga gacaggcagc ctcaaggatg cttttcaaca 34800
 atggttgatg agttggaact aaaacagggg ccatcacact ggctcccata gctctgggct 34860
 tgccagcttc cacatctgcc ccccccccc tgtctggcac cagctcaagc tctgtgattc 34920
 tacacatcca aaagaggaag agtagcctac tgggcatgcc acctcttctg gaccatcagg 34980
 tgagagtgtg gcaagcccta ggctcctgtc caggatgcag ggctgccaga taggatgtctc 35040
 agctatctcc tgagctggaa ctatttttag aataaggatt atgcccgcc ggggttggcc 35100
 agcaccaccag cagcctgtgc ttgctgtaaaa gcaagtgtctg ttgatttattc taaaaacaga 35160
 gccgtggacc caccacagc acaagtatgt atgcatctgt ttcattgtatc tgaaaagcga 35220
 cacaaccatt tttcacatca tggcatcttc ctaaccccc tctttttttg ttttgttttt 35280
 ttgagacagg gtttctctgt gtagtctctg ctgtcctgga actcactttg tagaccaggc 35340
 tggcctcgaa ctcagaaatc ctgggattaa aggtgtgtgc caccacgcc ggcctaacc 35400
 cccattctta atggtgatcc agtggttgaa atttcgggccc acacacatgt ccattagggg 35460
 ttagctgctg tcttctgagc tacctggtac aatctttatc cctcggggcc tgggctcctg 35520
 atccctgact cgggcccgat caagtccagt tctcgggccc gatcaagtcc agttcctggg 35580
 cccgaacaag tccagtccct agctcgatta gctcatcctg gctccttggc ctgttcttac 35640
 ttacactctt ccccttgtctc tggacttgtt gctttcttta ctcaagttgt ctgccacagt 35700
 ccctaagcca cctctgtaag acaactaaga taatacttcc ctcaagcacg gaaagtctg 35760
 agtcaccaca ccctctggag gtgtgtggac acatgttcat gcgtgtggtt gcgcttacgt 35820
 acgtgtgc 35828

<210>18
 <211>9301
 <212>ADN
 <213>Homo sapien

<400>18

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

5
 10

ES 2 272 093 T5

gaccaaaggt atgggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggttttaga 480
aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagaccca gtgaagattg ctggcctctg 540
ccagcactgg tcgaggaaca gtcttgccctg gaggtggggg aagaatggct cgctgggtgca 600
gccttcaaat tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tggtgagagc ccagggcagg 660
gaggacgctg gggtggtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag 720
aaaagaaaag gtttcaaaga atctcctcct gggaaatatag gagccacgct cagctgctgg 780
taccactggg aagggaaaca ggtaagggag cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg 840
caccggacac tctatgctgg tggtggtgtt ccccaccaca cagaccaca tcatggaatc 900
cccaggaggt gaacccccag ctggaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt 960
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgatcca actgcaagat agccctgggt 1020
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca 1080
ccctgcaggt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcaactgaa ggaatgggag 1140
ttttcgccac agtttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag 1200
agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccacc cagtcccaac 1260
cttgccctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaacctt gggttcctgg tcaggcctgc 1320
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcatct ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc 1380
atgggggctgt ctgaaatgac acttcagact aagagcttcc ctgtcctctg gccattatcc 1440
aggtggcaga gaagtccact gccagggctc ctggacccca gccctccccg cctcacaacc 1500
tgtttgggact atgggggtgt aaaaagggca actgcatggg aggccagcca ggacctccg 1560
tcttcaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc 1620
tgggtccag cgactgcctg aagggtgtga aggaacccaa acacaaaatg tccacctg 1680
tggactccca cgagaggcca cagcccctga ggaagccaca tgctcaaac aaagtcatga 1740
tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggag ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct 1800
tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc 1860
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctcccctgc 1920
tgtgcttgcct cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtcccctc tctggtttgg 1980
tcttaagact atttttcatt ctttctgtc acattggaac tatcccctag aaacctttgg 2040
gggtggactg gtactcacac gacgaccagc tatttaaaaa gctcccacc atctaagtcc 2100
accataggag acatggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc 2160
tctgcctgcc cagggagtat caccatgagg cgcctatca gataacacag aacaagaaat 2220
gtgccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtagg tttgggtcag 2280
agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc 2340
cccagcccag cctcccatgg atgctcgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa 2400
ggtgctggga ccccagggaa gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc 2460
ttttctctgg ctgggectca gtattctcat tgataatgag ggggttggac aactgcctt 2520
tgattccttt caagtctaat gaattcctgt cctgatcacc tcccctcag tcctcgcct 2580

ES 2 272 093 T5

ccacagcagc	tgccctgatt	tattaccttc	aattaacctc	tactcctttc	tccatcccct	2640
gtccaccctt	cccaagtggc	tggaaaagga	atltgggaga	agccagagcc	aggcagaagg	2700
tgtgctgagt	acttaccctg	cccaggccag	ggacctgcg	gcacaagtgt	ggcttaaatc	2760
ataagaagac	cccagaagag	aatgataat	aataatacat	aacagccgac	gctttcagct	2820
atatgtgcca	aatggatatt	tctgcattgc	gtgtgtaatg	gattaactcg	caatgcttgg	2880
ggcggcccat	tttgcagaca	ggaagaagag	agaggttaag	gaacttgccc	aagatgacac	2940
ctgcagtgag	cgatggagcc	ctgggtgttg	aaccccagca	gtcatttggc	tccgagggga	3000
cagggtgcg	aggagagctt	tccaccagct	ctagagcatc	tgggaccttc	ctgcaataga	3060
tgttcagggg	caaaagcctc	tggagacagg	cttggcaaaa	gcagggctgg	ggtggagaga	3120
gacgggcccg	tccagggcag	gggtggccag	gcgggcccgc	accctcacgc	gcgcctctct	3180
ccacagacgt	gtccgagtac	agctgcccg	agctgcactt	cacccgctac	gtgaccgatg	3240
ggccgtgccg	cagcgccaag	ccggtcaccg	agctgggtg	ctccggccag	tgcggcccgg	3300
cgcgcctgct	gccaacgcc	atcggcccg	gcaagtgggtg	gcgacctagt	gggcccgcact	3360
tccgctgcat	ccccgaccgc	taccgcgcgc	agcgcgtgca	gctgctgtgt	cccgggtggtg	3420
aggcgcgcg	cgcgcgcaag	gtgcgcctgg	tggcctcgtg	caagtgcaag	cgcctcaccc	3480
gcttccacaa	ccagtcggag	ctcaaggact	tccggaccga	ggccgctcgg	ccgcagaagg	3540
gccggaagcc	gcggccccgc	gcccggagcg	ccaaagccaa	ccaggccgag	ctggagaacg	3600
cctactagag	cccgcgccg	cccctcccc	ccggcggcg	ccccggccct	gaacccgcgc	3660
cccacatttc	tgtcctctgc	gcgtggtttg	attgtttata	tttcattgta	aatgcctgca	3720
accaggggca	gggggctgag	accttccagg	ccctgaggaa	tcccgggccc	cggcaaggcc	3780
cccctcagcc	gcgagctga	ggggctccac	ggggcagggg	agggaattga	gagtcacaga	3840
cactgagcca	cgcagccccg	cctctggggc	cgctacactt	tgctgggtccc	acttcagagg	3900
aggcagaaat	ggaagcattt	tcaccgccct	gggtttttaa	gggagcgggtg	tgggagtggg	3960
aaagtccagg	gactggttaa	gaaagtggga	taagattccc	ccttgcacct	cgctgccccat	4020
cagaaagcct	gaggcgtgcc	cagagcacia	gactgggggc	aactgtagat	gtgggtttcta	4080
gtcctggctc	tgccactaac	ttgctgtgta	accttgaact	acacaattct	ccttcgggac	4140
ctcaatttcc	actttgtaaa	atgagggtgg	agggtgggaat	aggatctcga	ggagactatt	4200
ggcatatgat	tccaaggact	ccagtgccctt	ttgaatgggc	agaggtgaga	gagagagaga	4260
gaaagagaga	gaatgaatgc	agttgcattg	attcagtgcc	aaggtcactt	ccagaattca	4320
gagttgtgat	gctctcttct	gacagccaaa	gatgaaaaac	aaacagaaaa	aaaaaagtaa	4380
agagtctatt	tatggctgac	atatttccgg	ctgacaaaat	cclyyaaya	gctatgctgc	4440
ttcccagcct	ggcttccccg	gatgtttggc	tacctccacc	cctccatctc	aaagaaataa	4500
catcatccat	tggggtagaa	aaggagaggg	tccgaggggtg	gtgggagggga	tagaaatcac	4560
atccgcccc	acttccccaa	gagcagcatc	cctccccgca	cccatagcca	tgttttaaag	4620
tcaccttccg	aagagaagtg	aaaggttcaa	ggacactggc	cttgcaggcc	cgagggagca	4680
gccatcacia	actcacagac	cagcacatcc	cttttgagac	accgccttct	gcccaccact	4740

ES 2 272 093 T5

cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc 4800
 ttacactaaa agaataattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac 4860
 tgcagagcat aatagctgcc acccaaaaat ctttttgaaa atcatttcca gacaacctct 4920
 tactttctgt gtagtttlla attgttaaaa aaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca 4980
 tatgaaagcc tgcaggactg gtcgtttttt tggcaattct tccacgtggg acttgtccac 5040
 aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttattttct cacttaagtt 5100
 atttatgcaa aagtttttct tgtagagaat gacaatgtta atattgcttt atgaattaac 5160
 agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag 5220
 gatgtgggtct cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc 5280
 tcttggctac tagagctcca accttggaca cacctttgac tgctctctgg tggcccttgt 5340
 ggcaattatg tcttcctttg aaaagtcatg tttatccctt cctttccaaa cccagaccgc 5400
 atttcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tccttttagc agcctccct 5460
 ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcactc ccctgctcaa aagccttcca 5520
 tagctcccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggcttctct 5580
 gcttgactcc cacctcccac tccaccaagc ttcctactga ctccaaatgg tcatgcagat 5640
 ccctgcttcc ttagtttgcc atccacactt agcaccocca ataactaatc ctctttcttt 5700
 aggattcaca ttacttgtca tctcttcccc taaccttcca gagatgttcc aatctcccat 5760
 gatccctctc tcctctgagg ttccagccc ttttgtctac accactactt tggttcctaa 5820
 ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta 5880
 ctggcataga caacacaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct 5940
 tcttcgaagt gtggatttga tgcctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggcc 6000
 agcctcctgc acttctctca aagtctcgc tccccaaggt gtcttaatag tgcctgatgc 6060
 tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgcctaa 6120
 ggtgggatgg tcaactggaa agctttaaat taagtccagc ctacctggg ggaaccacc 6180
 cccacaaaga aagctgaggt ccctcctgat gacttgtcag tttactacc aataaccac 6240
 ttgaattaat catcatcatc aagtcttga taggtgtgag tgggtatcag tggccgtcc 6300
 cttcctgggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagttagcc cctgcagaaa atccatgat 6360
 catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggtagga aacagagaca tcttccatcc 6420
 ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgttgt 6480
 tgtttgtttg ttttgagaca gagtctcgt ctattgccca ggctggagtg cagtgtcaca 6540
 atctcggctt actgcaact ctgccttccc ggattcaagt gattctctg cctcagcctc 6600
 cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaatttttg tatttttgat 6660
 agagacgggg tttcaccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct 6720
 gcctgcctcg gcctcccaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccaca cccagccca 6780
 ggttgggtgt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaatgttt tgcccacagc 6840
 catactggg cttagttcct tgcctacc ctacttgag ctgcttagaa cctgggtggc 6900

ES 2 272 093 T5

acatgggcaa	taaccaggtc	acactgtttt	gtaccaagtg	ttatgggaat	ccaagatagg	6960
agtaatttgc	tctgtggagg	ggatgagggg	tagtggttag	ggaaagcttc	acaaagtggg	7020
tgttgcttag	agattttcca	ggtaggagaag	ggggcttcta	ggcagaaggc	atagcccaag	7080
caaagactgc	aagtgcgatg	ctgctcatgg	gtagaagaga	atccaccatt	cctcaacatg	7140
taccgagtcc	ttgccatgtg	caaggcaaca	tgggggtacc	aggaattcca	agcaatgtcc	7200
aaacctaggg	tctgctttct	gggacctgaa	gatacaggat	ggatcagccc	aggctgcaat	7260
cccattacca	cgagggggaa	aaaaacctga	aggctaatt	gtaggtcggg	ttagaggtta	7320
tttatggaaa	gttatattct	acctacatgg	ggctataag	cctggcgcca	atcagaaaag	7380
gaacaaacaa	cagacctagc	tgggaggggc	agcattttgt	tgtagggggc	ggggcacatg	7440
ttctgggggt	acagccagac	tcagggcttg	tattaatagt	ctgagagtaa	gacagacaga	7500
gggatagaag	gaaataggtc	cctttctctc	tctctctctc	tctctctctc	actctctctc	7560
tctctcacac	acacacacag	acacacacac	acgctctgta	ggggcttact	tatgctccaa	7620
gtacaaatca	ggccacattt	acacaaggag	gtaaaggaaa	agaacgttgg	aggagccaca	7680
ggaccccaaa	attcctgtt	ttccttgaat	caggcaggac	ttacgcagct	gggagggtgg	7740
agagcctgca	gaagccacct	gcgagtaagc	caagttcaga	gtcacagaca	ccaaaagctg	7800
gtgccatgtc	ccacaccgc	ccacctcca	cctgctcctt	gacacagccc	tgtgctccac	7860
aaccggctc	ccagatcatt	gattatagct	ctggggcctg	caccgtcctt	cctgccacat	7920
ccccaccca	ttcttggaa	ctgccctctg	tcttctccct	tgtccaaggg	caggcaaggg	7980
ctcagctatt	gggcagcttt	gaccaacagc	tgaggctcct	tttgtggctg	gagatgcagg	8040
aggcagggga	atattcctct	tagtcaatgc	gacatgtgc	ctggtttgcc	cagggtggtc	8100
tcgtttacac	ctgtaggcca	agcgtaat	ttaacagctc	ccacttctac	tctaaaaaat	8160
gacccaatct	gggcagtaaa	ttatatggtg	cccatgctat	taagagctgc	aacttgetgg	8220
gcgtgggtgc	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	gaacccaggt	aatgaatgag	gagaagagag	gggctgagtc	accatagtgg	8580
cagcacccgac	tcctgcagga	aaggcgagac	actgggtcat	gggtactgaa	gggtgccctg	8640
aatgacgttc	tgcttttagag	accgaacctg	agccctgaaa	gtgcatgcct	gttcatgggt	8700
gagagactaa	attcatcatt	ccttggcagg	tactgaatcc	tttctttagg	ctgccctcca	8760
atgcccaatt	tcctacaat	tgtctgggg	gcctaagctt	ctgcccacca	agagggccag	8820
agctggcagc	gagcagctgc	aggtaggaga	gataggtagc	cataaggag	gtgggaaaga	8880
gagatggaag	gagaggggtg	cagagcacac	acctccctg	cctgacaact	tcctgagggc	8940
tggatcatgcc	agcagattta	aggcggaggc	aggggagatg	gggcgggaga	ggaagtgaaa	9000
aaggagaggg	tggggatgga	gaggaagaga	gggtgatcat	tcattcattc	cattgctact	9060

ES 2 272 093 T5

	gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctct gggcatgtgg ttgtaatctt	9120
	ggagcctcat ggagctcaca gggagtgctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa	9180
	ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctgggtg	9240
	agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag	9300
	c	9301
5	<210>19 <211>21 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
10	<220> <223>Cebador para PCR <400>19	
	ccggagctgg agaacaacaa g	21
15	<210>20 <211>19 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
20	<220> <223>Cebador para PCR <400>20	
25	gcactggccg gagcacacc	19
30	<210>21 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
35	<220> <223>Cebador para PCR <400>21	
40	aggccaaccg cgagaagatg acc	23
45	<210>22 <211>21 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
50	<220> <223>Cebador para PCR <400>22	
55	gaagtccagg gcgacgtagc a	21
	<210>23 <211>25 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
	<220> <223>Cebador para PCR <400>23	

ES 2 272 093 T5

	aagcttggtgta ccatgcagct cccac	25
	<210>24 <211>50 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
5		
	<220> <223>Cebador para PCR	
10	<400>24	
	aagcttctac ttgtcatcgt cgtccttgta gtcgtaggcg ttctccagct	50
	<210>25 <211>19 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
15		
	<220> <223>Cebador para PCR	
20	<400>25 gcactggccg gagcacacc	19
	<210>26 <211>39 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
25		
	<220> <223>Cebador para PCR	
30	<400>26 gtcgtcggat ccatggggtg gcagggcttc aagaatgat	39
	<210>27 <211>57 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
35		
	<220> <223>Cebador para PCR	
40	<400>27 gtcgtcaagc ttctacttgt catcgtcctt gtagtcgtag gcgttctcca gctcggc	57
	<210>28 <211>29 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
45		
	<220> <223>Cebador para PCR	
50	<400>28 gacttggatc ccaggggtgg cagggcttc	29
	<210>29 <211>29 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
55		
	<220> <223>Cebador para PCR	
60		

ES 2 272 093 T5

<400>29
 agcataagct tctagtaggc gttctccag 29

5 <210>30
 <211>29
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

10 <220>
 <223>Cebador para PCR

<400>30
 gacttggatc cgaagggaaa aagaaaggg 29

15 <210>31
 <211>29
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

20 <220>
 <223>Cebador para PCR

<400>31
 agcataagct tttaatccaa atcgatgga 29

25 <210>32
 <211>33
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

30 <220>
 <223>Cebador para PCR

<400>32
 actacgagct cggccccacc acccatcaac aag 33

35 <210>33
 <211>34
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

40 <220>
 <223>Cebador para PCR

<400>33
 acttagaagc tttcagtcct cagccccctc ttcc 34

45 <210>34
 <211>66
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

50 <220>
 <223>Cebador para PCR

55 <400>34
 aatctggatc cataacttcg tatagcatac attatacgaa gttatctgca ggattcgagg 60
 gccct 66

ES 2 272 093 T5

<210>35
 <211>82
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223>Cebador para PCR

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

 <210>36
 <211>62
 <212>ADN
 15 <213>Secuencia Artificial

 <220>
 <223>Cebador para PCR

 20 <400>36
 atttaggtga cactatagaa ctcgagcagc tgaagcttaa ccacatggtg gctcacaacc 60
 at 62

 <210>37
 <211>54
 <212>ADN
 25 <213>Secuencia Artificial

 <220>
 <223>Cebador para PCR

 30 <400>37

 aacgacggcc agtgaatccg taatcatggt catgctgccca ggtggaggag ggca 54

 <210>38
 <211>31
 <212>ADN
 35 <213>Secuencia Artificial

 <220>
 <223>Cebador para PCR

 40 <400>38

 attaccaccg gtgacacccg cttcctgaca g 31

 <210>39
 <211>61
 <212>ADN
 45 <213>Secuencia Artificial

 <220>
 <223>Cebador para PCR

 50 <400>39

 attacttaat taaacatggc gcgccatatg gccggcccct aattgcgggc catcgttaat 60
 t 61

 <210>40
 <211>34
 <212>ADN
 55

ES 2 272 093 T5

<213>Secuencia Artificial
<220>
<223>Cebador para PCR
5
<400>40
attacggccg gccgcaaagg aattcaagat ctga - 34

<210>41
<211>34
10 <212>ADN
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>Cebador para PCR
15 <400>41
attacggcgc gccctcaca ggccgcaccc agct 34

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. 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.
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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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 es una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15
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.
- 30 10. El vector de expresión según la reivindicación 8, donde dicho promotor es un promotor específico de un tejido.
- 35 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.
- 40 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.
13. El método según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente la etapa de purificar dicha proteína.
- 45 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 es una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15.
- 50 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.
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.
- 55 17. Una célula huésped que porta un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 y 14 a 16.
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.
- 60 19. Una proteína aislada, que comprende una proteína de unión a TGF-beta del SEQ ID NO: 2, 6, 10, 12, 14 o 16.
- 65 20. Un Anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, que se une a una proteína de unión a TGF-beta codificada por una molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15 con una K_a mayor o igual a 10^8 M^{-1} y 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 del SEQ ID NO. 2, 6, 10, 12 o 14.

- 5 22. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación20, donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento es un anticuerpo o fragmento de ratón o humano.
23. El fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a22, donde dicho fragmento se selecciona del grupo formado por F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab y Fv.
- 10 24. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 que está humanizado.
25. Uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24 en la fabricación de un medicamento para incrementar la mineralización ósea en un animal de sangre caliente.
- 15 26. Uso según la reivindicación25, donde el animal de sangre caliente tiene osteopenia.
27. El uso según la reivindicación26, 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.
- 20 28. El uso según la reivindicación25, donde el animal tiene osteoporosis.
- 25 29. El uso según la reivindicación25, 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.
- 30 30. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 35 31. 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 24 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.
- 40 32. El método según la reivindicación31, donde dicho anticuerpo está unido a un soporte sólido.
33. El método según la reivindicación31 o 32, donde dicho anticuerpo está marcado.
- 45 34. El método según la reivindicación33, donde dicho anticuerpo está marcado con un marcador seleccionado del grupo formado por enzimas, proteínas fluorescentes y radioisótopos.
- 50 35. 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 es una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15 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.
- 55 36. El animal transgénico según la reivindicación 35, donde la proteína de unión a TGF-beta es expresada a partir de un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
37. Un animal transgénico según la reivindicación35 o 36, donde la proteína de unión a TGF-beta comprende la proteína del SEQ ID NO. 2, 6, 10, 12, 14 o 16.
- 60 38. 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, siendo la molécula de ácido nucleico endógena una molécula de ácido nucleico que comprende el SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15 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.
- 65 39. El animal transgénico según la reivindicación38, donde dicha desorganización es una delección,

sustitución o inserción de ácido nucleico.

40. El animal transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, donde el animal se selecciona del grupo formado por un ratón, una rata y un perro.

5

41. 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 24.

Esqueleto de Cisteína Común

1				50	
human_gremlin.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_cerberus.pro	MHLLLFQLLV	LLPLGKTTRH	QDGRQNQSSL	SPVLLPRNQR	ELPTGNHEEA
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_beer.pro	-----	-----	-----	-----	-----
	51				100
human_gremlin.pro	-----	-----M	SRTAYTVGAL	LLLLGTLTPA	AEGKKKGSQG
human_cerberus.pro	EKPDLFVAV	PHLVAT.SPA	GEGQRQREKM	LSRFGRFWKK	PEREMHPSRD
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_beer.pro	-----	-----	-----	----MQLPLA	LCLVCLLVHT
	101				150
human_gremlin.pro	AI.PPPDKAQ	HNDSEQTQSP	QQPGSRNRGR	GQGRGTAMPG	EEVLESSQEA
human_cerberus.pro	SDSEFPFPGT	QSLIQPID.G	MKMEKSPLRE	EAKKFWHHFM	FRKTPASQGV
human_dan.pro	-----	-----	-----	MLRVLVGAVL	PAMLLAAPP
human_beer.pro	AFRVVEGQGW	QAFKNDATEI	IPELGEYPEP	PPELENNKTM	NRAENGRPP
	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	KSIQNRA.CL	GQCFSYSVFN
human_beer.pro	HHPFETKDVS	EYSCRELHFT	RYVTDGPCRS	AKPVTELVCS	GQCGPARLLP
	201	↓	↓		250
human_gremlin.pro	HIRKEEGSFQ	SCSF...CKP	KKFTTMMVTL	NCPQLQPPTK	K.KRVTRVKQ
human_cerberus.pro	..GAAQHSHT	SCSH...CLP	AKFTTMHLPL	NCTELSSVIK	V...VMLVEE
human_dan.pro	TFPQSTESLV	HCDS...CMP	AQSMWEIVTL	ECPGHEEVPR	VDKLVEKILH
human_beer.pro	NAIGRGKWR	PSGPDFRCIP	DRYRAQRVQL	LCPGGEAPRA	RKVRLVAS..
	↓↓				300
human_gremlin.pro	CRC.ISIDLD	-----	-----	-----	-----
human_cerberus.pro	CQCKVKTEHE	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

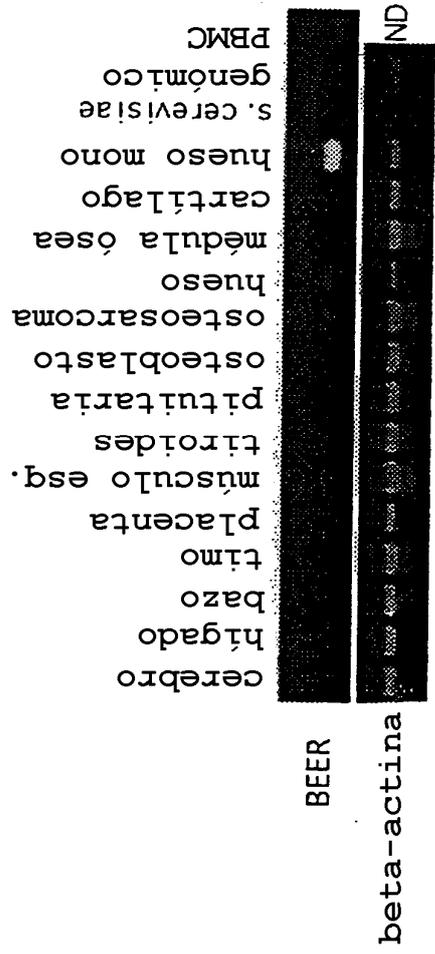


Fig. 2

Hibridación In Situ de ARN de Secciones de Embrión de Ratón

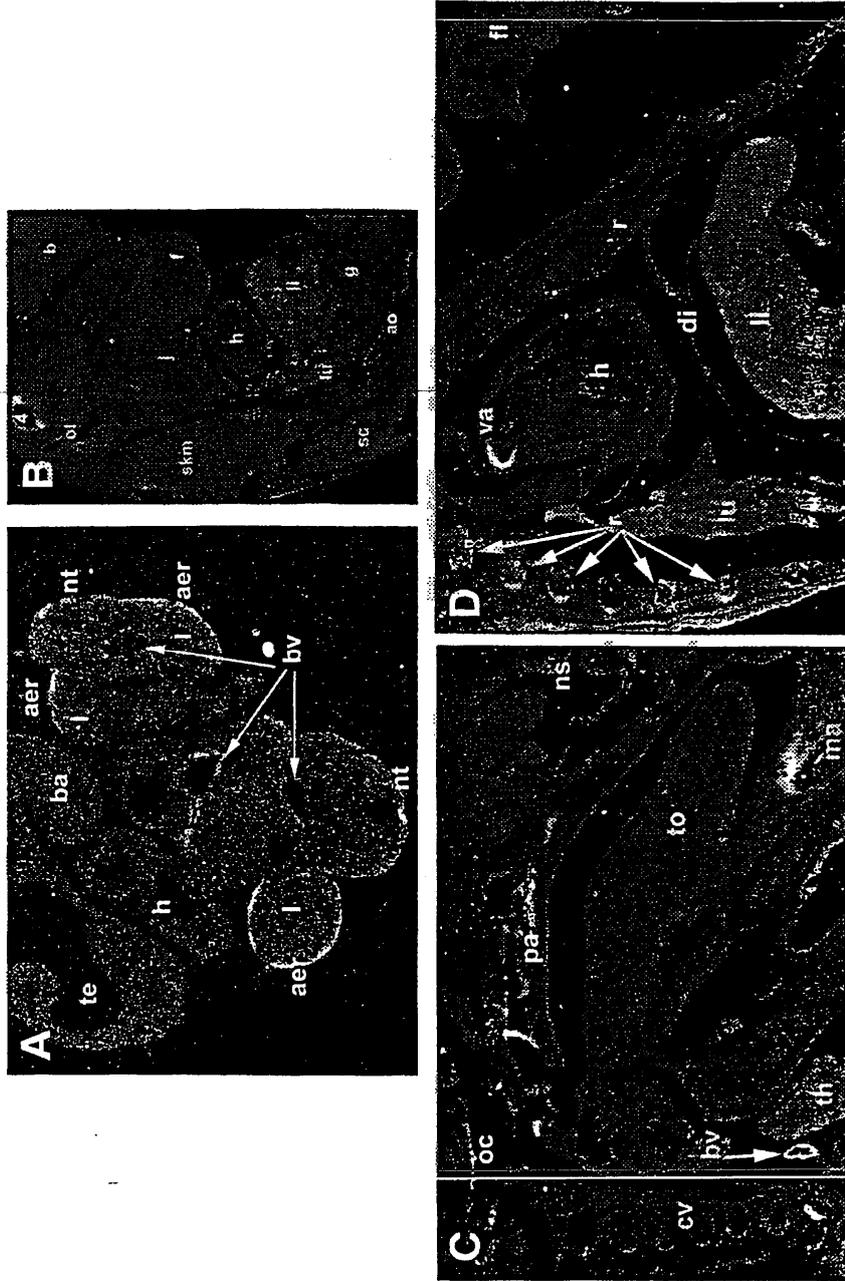


Fig. 3

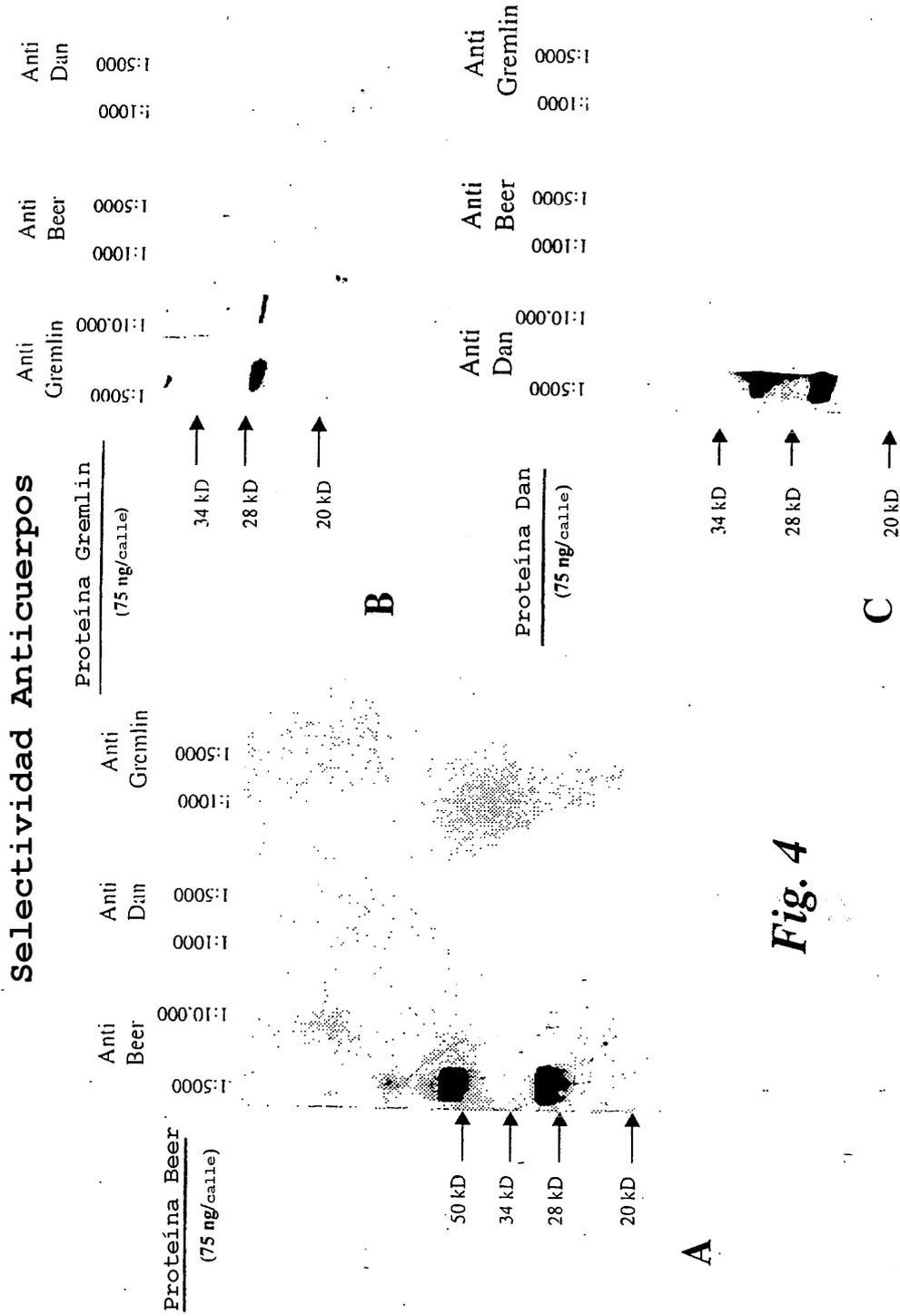
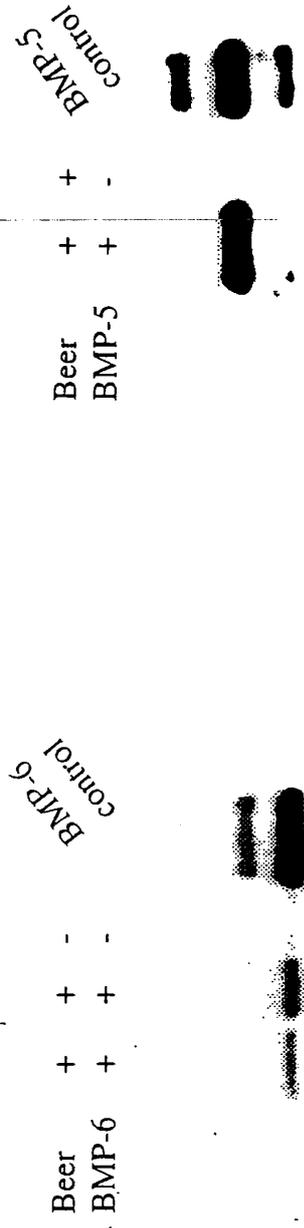


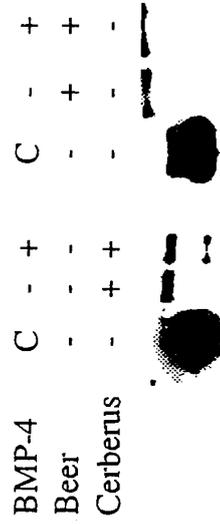
Fig. 4

Evaluación de la unión Beer a miembros de la familia BMP
 Inmunoprecipitación Anti-FLAG



*transferencia western Anti-BMP-6

*transferencia western Anti-BMP-5

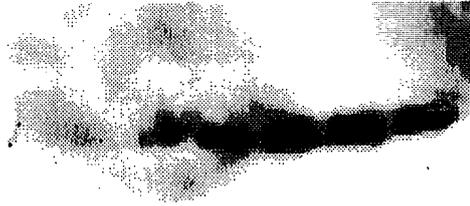


*transferencia western Anti-BMP-4

Fig. 5

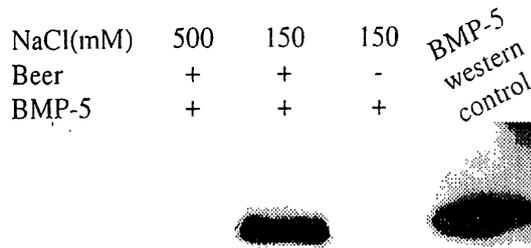
Caracterización de la Constante de Disociación de BMP-5/Beer

,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