

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 229**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08707977 .8**
96 Fecha de presentación: **18.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2121944**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **MODELOS DE SELECCIÓN IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y OTROS TRASTORNOS RELACIONADOS CON QPCT.**

30 Prioridad:
19.01.2007 US 885649 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.01.2012

73 Titular/es:
**PROBIODRUG AG
WEINBERGWEG 22
06120 HALLE/SAALE, DE**

72 Inventor/es:
**SCHILLING, Stephan;
CYNIS, Holger;
HOFFMANN, Torsten;
DEMUTH, Hans-Ulrich;
WERMANN, Michael y
SCHULZ, Katrin**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 372 229 T3

DESCRIPCIÓN

Modelos de selección *in vivo* para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos relacionados con QPCT

La presente invención se refiere en general a animales transgénicos así como a métodos y composiciones para seleccionar, especialmente en relación con glutaminil ciclasa.

En particular, la invención se refiere a Qpct (es decir, glutaminil péptido ciclotransferasa), también denominada glutaminil ciclasa (QC, EC 2.3.2.5) que cataliza la ciclación intramolecular de residuos de glutamina N-terminales para dar ácido piroglutámico (5-oxo-prolina, pGlu*) con liberación de amoníaco y la ciclación intramolecular de residuos de glutamato N-terminales para dar ácido piroglutámico con liberación de agua.

Messer aisló por primera vez una QC del látex de la planta tropical *Carica papaya* en 1963 (Messer, M. 1963 Nature 4874, 1299). 24 años más tarde, se descubrió una actividad enzimática correspondiente en la hipófisis animal (Busby, W. H. J. *et al.* 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536; Fischer, W. H. y Spiess, J. 1987 Proc Natl Acad Sci U S A 84, 3628-3632). Para la QC de mamífero, podía mostrarse la conversión de Gln en pGlu mediante la QC para los precursores de TRH y GnRH (Busby, W. H. J. *et al.* 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536; Fischer, W. H. y Spiess, J. 1987 Proc Natl Acad Sci U S A 84, 3628-3632). Además, experimentos de ubicación iniciales de QC revelaron una localización conjunta con sus supuestos productos de catálisis en hipófisis bovina, mejorando además la función sugerida en la síntesis de hormonas peptídicas (Bockers, T. M. *et al.* 1995 J Neuroendocrinol 7, 445-453). En cambio, la función fisiológica de la QC vegetal es menos clara. En el caso de la enzima de *C. papaya*, se sugirió un papel en la defensa de la planta frente a microorganismos patógenos (El Moussaoui, A. *et al.* 2001 Cell Mol Life Sci 58, 556-570). Recientemente, se identificaron supuestas QC de otras plantas mediante comparaciones de secuencias (Dahl, S. W. *et al.* 2000 Protein Expr Purif 20, 27-36). La función fisiológica de estas enzimas, sin embargo, es todavía ambigua.

Las QC conocidas de plantas y animales muestran una especificidad estricta para L-glutamina en la posición N-terminal de los sustratos y se encontró que su comportamiento cinético obedecía a la ecuación de Michaelis-Menten (Pohl, T. *et al.* 1991 Proc Natl Acad Sci U S A 88, 10059-10063; Consalvo, A. P. *et al.* 1988 Anal Biochem 175, 131-138; Gololobov, M. Y. *et al.* 1996 Biol Chem Hoppe Seyler 377, 395-398). Una comparación de las estructuras primarias de las QC de *C. papaya* y la de la QC de mamífero altamente conservada, sin embargo, no reveló ninguna homología de secuencia (Dahl, S. W. *et al.* 2000 Protein Expr Purif 20, 27-36). Mientras que las QC vegetales parecen pertenecer a una nueva familia de enzimas (Dahl, S. W. *et al.* 2000 Protein Expr Purif 20, 27-36), se encontró que las QC de mamífero tenían una homología de secuencia pronunciada con aminopeptidasas bacterianas (Bateman, R. C. *et al.* 2001 Biochemistry 40, 11246-11250), lo que condujo a la conclusión de que las QC de plantas y animales tienen diferentes orígenes evolutivos.

El documento EP 02 011 349.4 da a conocer polinucleótidos que codifican para glutaminil ciclasa de insecto, así como polipéptidos codificados por los mismos. Esta solicitud proporciona además células huésped que comprenden vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos de la invención. Los polipéptidos aislados y las células huésped que comprenden QC de insecto son útiles en métodos de selección de agentes que reducen la actividad glutaminil ciclasa. Tales agentes se describen como útiles como pesticidas.

La materia de la presente invención es particularmente útil en el campo de enfermedades relacionadas con glutaminil ciclasa, siendo un ejemplo de las mismas la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la acumulación anómala de placas amiloidóticas extracelulares estrechamente asociadas con neuronas distróficas, astrocitos reactivos y microglía (Terry, R. D. y Katzman, R. 1983 Ann Neurol 14, 497-506; Glenner, G. G. y Wong, C. W. 1984 Biochem Biophys Res Comm 120, 885-890; Intagaki, S. *et al.* 1989 J Neuroimmunol 24, 173-182; Funato, H. *et al.* 1998 Am J Pathol 152, 983-992; Selkoe, D. J. 2001 Physiol Rev 81, 741-766). Los péptidos beta amiloides (abreviado como A β) son los componentes primarios de las placas seniles y se considera que están directamente implicados en la patogénesis y progresión de la EA, una hipótesis apoyada por estudios genéticos (Glenner, G. G. y Wong, C. W. 1984 Biochem Biophys Res Comm 120, 885-890; Borchelt, D. R. *et al.* 1996 Neuron 17, 1005-1013; Lemere, C. A. *et al.* 1996 Nat Med 2, 1146-1150; Mann, D. M. y Iwatsubo, T. 1996 Neurodegeneration 5, 115-120; Citron, M. *et al.* 1997 Nat Med 3, 67-72; Selkoe, D. J. 2001 Physiol Rev 81, 741-766). Se genera A β mediante procesamiento proteolítico de la proteína precursora de β -amiloide (APP) (Kang, J. *et al.* 1987 Nature 325, 733-736; Selkoe, D. J. 1998 Trends Cell Biol 8, 447-453), que se escinde secuencialmente por β -secretasa en el extremo N-terminal y por γ -secretasa en el extremo C-terminal de A β (Haass, C. y Selkoe, D. J. 1993 Cell 75, 1039-1042; Simons, M. *et al.* 1996 J Neurosci 16 899-908). Además de los péptidos de A β dominantes que comienzan con L-Asp en el extremo N-terminal (A β 1-42/40), aparece una gran heterogeneidad de formas truncadas en el extremo N-terminal en las placas seniles. Se notifica que tales péptidos acortados son más neurotóxicos *in vitro* y se agregan más rápidamente que las isoformas de longitud completa (Pike, C. J. *et al.* 1995 J Biol Chem 270, 23895-23898). Se sabe que se sobreproducen péptidos N-truncados en sujetos con EA familiar de aparición temprana (EAF) (Saido, T. C. *et al.* 1995 Neuron 14, 457-466; Russo, C. *et al.* 2000 Nature 405, 531-532), que aparecen de manera temprana y aumentan con la edad en cerebros con síndrome de Down (SD) (Russo, C. *et al.* 1997 FEBS Lett 409, 411-416; Russo, C. *et al.* 2001 Neurobiol Dis 8, 173-180; Tekirian, T. L. *et al.* 1998 J Neuropathol Exp Neurol 57, 76-94). Finalmente, su cantidad refleja la gravedad progresiva de la enfermedad (Russo,

C. *et al.* 1997 FEBS Lett 409, 411-416; Guntert, A. *et al.* 2006 Neuroscience 143, 461-475). Procesos postraduccionales adicionales pueden modificar adicionalmente el extremo N-terminal mediante isomerización o racemización del aspartato en la posición 1 y 7 y mediante ciclación de glutamato en los residuos 3 y 11. Las isoformas que contienen piroglutamato en la posición 3 [pGlu³Aβ3-40/42] representan las formas prominentes, aproximadamente el 50% de la cantidad de Aβ total, de las especies N-truncadas en placas seniles (Mori, H. *et al.* 1992 J Biol Chem 267, 17082-17086; Saido, T. C. *et al.* 1995 Neuron 14, 457-466; Russo, C. *et al.* 1997 FEBS Lett 409, 411-416; Tekirian, T. L. *et al.* 1998 J Neuropathol Exp Neurol 57, 76-94; Geddes, J. W. *et al.* 1999 Neurobiol Aging 20, 75-79; Harigaya, Y. *et al.* 2000 Biochem Biophys Res Commun 276, 422-427) y también están presentes en lesiones preamiloides (Lalowski, M. *et al.* 1996 J Biol Chem 271, 33623-33631). La acumulación de péptidos AβN3 (pE) se debe probablemente a la modificación estructural que potencia la agregación y confiere resistencia frente a la mayoría de aminopeptidasas (Saido, T. C. *et al.* 1995 Neuron 14, 457-466; Tekirian, T. L. *et al.* 1999 J Neurochem 73, 1584-1589). Estas pruebas proporcionan claves de un papel fundamental de los péptidos AβN3 (pE) en la patogénesis de la EA. Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre sus propiedades de agregación y neurotoxicidad (He, W. y Barrow, C. J. 1999 Biochemistry 38, 10871-10877; Tekirian, T. L. *et al.* 1999 J Neurochem 73, 1584-1589). Además, la acción de estas isoformas sobre células gliales y la respuesta glial a estos péptidos se desconocen completamente, aunque la glía activada está asociada estrictamente con placas seniles y podría contribuir activamente a la acumulación de depósitos amiloides. En estudios recientes, se investigaron la toxicidad, propiedades de agregación y catabolismo de los péptidos Aβ1-42, Aβ1-40, [pGlu³]Aβ3-42, [pGlu³]Aβ3-40, [pGlu¹¹]Aββ11-42 y [pGlu¹¹]Aβ11-40 en cultivos de células gliales y neuronales, y se mostró que la modificación con piroglutamato exagera las propiedades tóxicas de péptidos de Aβ y también inhibe su degradación por astrocitos cultivados. Shirotani *et al.* investigaron la generación de péptidos [pGlu³]Aβ en neuronas corticales primarias infectadas con virus Sindbis *in vitro*. Construyeron ADN complementarios de proteína precursora de amiloide, que codificaban para un posible precursor de [pGlu³]Aβ mediante delección y sustitución de aminoácidos. Para un precursor artificial que comienza con un residuo de glutamina N-terminal en lugar de glutamato en el precursor natural, se sugirió una conversión espontánea o una conversión enzimática mediante glutaminil ciclase a piroglutamato. El mecanismo de ciclación del glutamato N-terminal en la posición 3 en el precursor natural de [pGlu³]Aβ no se determinó ni *in vitro*, ni *in situ* ni *in vivo* (Shirotani, K. *et al.* 2002 NeuroSci Lett 327, 25-28). Schilling da a conocer el mecanismo catalítico de la glutaminil ciclase, en particular la capacidad de esta enzima para catalizar la ciclación de residuos de glutamato a piroglutamato en el extremo N-terminal de péptidos, y muestra que la glutaminil ciclase puede formar péptidos de Aβ modificados con pGlu *in vitro*. Además, Schilling da a conocer que la inhibición de la glutaminil ciclase puede tener un efecto terapéutico en la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down (Schilling, S.: Charakterisierung der humanen Glutaminyl-Cyclase im Vergleich mit dem analogen Enzym aus *Carica papaya*. Kumulative Dissertation, ULB Sachsen-Anhalt, 5 de mayo de 2004).

Snaith *et al.* han revisado el potencial de la ingeniería genética para establecer modelos de animales transgénicos para lograr pruebas farmacológicas más eficaces y el desarrollo en diferentes campos de investigación farmacéutica, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Snaith *et al.* 2002 Briefings in functional genomics and proteomics, vol. 1 n.º 2, 119-130).

Resumen de la invención

La presente invención comprende métodos y composiciones para modelos transgénicos no humanos, en particular mamíferos, para enfermedades relacionadas con glutaminil ciclase. Específicamente, la presente invención comprende modelos de animales transgénicos no humanos que sobreexpresan glutaminil ciclase.

La presente invención comprende además métodos para seleccionar agentes biológicamente activos que modulan enfermedades relacionadas con glutaminil ciclase incluyendo, pero sin limitarse a, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Alzheimer (EA), angiopatía amiloide cerebral, demencia con cuerpos de Lewy, neurodegeneración en síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), demencia danesa familiar, demencia británica familiar, enfermedad de úlcera y cáncer gástrico con o sin infecciones de *Helicobacter pylori*, estados psicóticos patógenos, esquizofrenia, esterilidad, neoplasia, respuestas inflamatorias del huésped, cáncer, psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, rechazo de injertos, corea de Huntington (HD), respuestas inmunitarias humoral y mediada por células alteradas, procesos de migración y adhesión leucocitaria en el endotelio, ingesta de alimentos alterada, sueño-vigilia, regulación homeostática alterada del metabolismo energético, función autónoma alterada, equilibrio hormonal alterado y regulación alterada de fluidos corporales y el complejo de Parkinson-demencia de Guam. Otro aspecto de la presente invención comprende métodos y composiciones para seleccionar inhibidores de glutaminil ciclase.

Por consiguiente, un objeto de la invención es proporcionar un animal transgénico, que sobreexpresa glutaminil ciclase.

Otro objeto de la invención es proporcionar constructos de ADN que codifican para glutaminil ciclase.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar constructos de ADN que codifican para glutaminil ciclase ligados a un promotor.

Un objeto más de la invención es proporcionar un sistema modelo de animal transgénico no humano.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un sistema modelo de animal transgénico no humano para estudiar la regulación *in vivo* e *in vitro* y los efectos de glutaminil ciclasa en tipos de tejido específicos.

5 Se mostró mediante estudios de inhibición que QC humana y murina son transferasas dependientes de metales. La apoenzima de QC podría reactivarse lo más eficazmente mediante iones zinc, y el motivo de unión a metal de las aminopeptidasas dependientes de zinc está también presente en la QC humana. Los compuestos que interaccionan con el metal unido al sitio activo son potentes inhibidores.

10 Inesperadamente, se mostró que QC humana recombinante así como la actividad de QC de extractos de cerebro catalizan ambas la ciclación de glutamato así como glutaminilo N-terminal. Lo más sorprendente es el hallazgo de que la conversión de Glu¹ catalizada por QC se ve favorecida a aproximadamente pH 6,0 mientras que la conversión de Gln¹ a derivados de pGlu se produce con un pH óptimo de aproximadamente 8,0. Puesto que la formación de péptidos relacionados con pGlu-A β puede suprimirse mediante la inhibición de QC humana recombinante y la actividad de QC de extractos de hipófisis de cerdo, la enzima QC es una diana para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de por ejemplo la enfermedad de Alzheimer.

15 Administrando efectores de la actividad de QC a un mamífero, puede ser posible prevenir o aliviar o tratar estados seleccionados de deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Alzheimer (EA), angiopatía amiloide cerebral, demencia con cuerpos de Lewy, neurodegeneración en síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), demencia danesa familiar, demencia británica familiar, enfermedad de úlcera y cáncer gástrico con o sin infecciones de *Helicobacter pylori*, estados psicóticos patógenos, esquizofrenia, esterilidad, neoplasia, respuestas inflamatorias del huésped, cáncer, psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, rechazo de injertos, corea de Huntington (HD), respuestas inmunitarias humoral y mediada por células alteradas, procesos de migración y adhesión leucocitaria en el endotelio, ingesta de alimentos alterada, sueño-vigilia, regulación homeostática alterada del metabolismo energético, función autónoma alterada, equilibrio hormonal alterado y regulación alterada de fluidos corporales.

Además, mediante la administración de efectores de la actividad de QC a un mamífero, puede ser posible estimular la proliferación de células del tubo digestivo, preferiblemente la proliferación de células de la mucosa gástrica, células epiteliales, la secreción aguda de ácido y la diferenciación de células parietales productoras de ácido y células de tipo enterocromafina que secretan histamina.

30 Además, mediante la administración de efectores de la actividad de QC a un mamífero, puede ser posible suprimir la proliferación de células progenitoras mieloides.

Además, la administración de inhibidores de QC puede conducir a la supresión de la fertilidad masculina.

Breve descripción de las figuras

35 Se obtendrá una comprensión adicional de estos y otros aspectos de la presente invención con referencia a las figuras, que representan lo siguiente:

Figura 1 A y B:

(A) Mapa del ADNc del plásmido 'mQC en el vector pPCR Script Cam SK(+)' que muestra la presencia del casete de ADNc de Qpct murino.

40 (B) Secuencia de la unión estructura principal del vector- ADNc. Debido a la secuencia de restricción de SphI en el cebador utilizado para la clonación, se insertó un ATG adicional 4 pb en el sentido de 5' del codón de iniciación en el vector pPCR Script Cam SK(+).

Figura 2: Estrategia de clonación.

45 Se aisló en primer lugar el ADNc de Qpct mediante NsiI y NotI de la estructura principal del vector pPCR-Script Cam SK(+) y se subclonó mediante PstI y NotI en el pBlueScript SK+ (1 + 2). Posteriormente, se subclonó el casete de ADNc mediante los sitios de restricción HindIII y NotI en un plásmido CAG Pr en pcADN3.1 (3 + 4). El pTG-CAG-mQC resultante consiste en el casete de ADNc de Qpct bajo el control de un promotor CAG de expresión ubicua y la señal de poli A de BGH.

Figura 3: Mapa de restricción del plásmido de constructo transgénico pTG-CAG-mQC y su análisis de restricción.

50 (A) Las regiones secuenciadas se marcan como líneas estrechas (SEQ ID No: 1 y 2). Los sitios de unión de los cebadores de genotipado y los sitios de restricción de las enzimas usadas en el análisis de restricción se indican en el mapa del plásmido. La posición de los cebadores de genotipado (CAG-Pr-F1 y GX1675-TOR1-FF) se muestra como flechas grises (B, C). Todos los digestos de ADN dieron como resultado los tamaños de fragmento esperados

tal como se pronostica en la tabla M: MassRuler DNA-Ladder Mix (GeneRuler; MBI).

Figura 4: Pruebas de la sensibilidad de la PCR de selección.

Se realizó la selección por PCR optimizada usando diluciones en serie del plásmido pTG-CAG-mQC en H₂O (- ADN WT) o en 150 µg de ADN de tipo natural genómico (+ ADN WT). Se sometieron a prueba el equivalente de 0,1, 1 y 10 copias del vector transgénico por genoma de ratón. La amplificación por PCR del ADN transgénico con el par de cebadores CAG-Pr-F1/GX1675 produjo un producto de 1585 pb. Se incluyeron ADN genómico de tipo natural (WT) y H₂O (Ø) como controles negativos. M: marcador de tamaño molecular de ADN de 1 kb (New England Biolabs, NEB).

Figura 5: Preparación y validación del constructo transgénico pTG-CAG-mQC.

(A) Mapa de plásmido del vector pTG-CAG-mQC que indica los sitios de restricción de Sall y DraIII y los sitios de unión para los cebadores de selección. (B) Restricción mediante DraIII/Sall de pTG-CAG-mQC (1) y el constructo transgénico aislado (2). M: marcador de tamaño molecular de ADN de 1 kb (New England Biolabs, NEB).

Figura 6: Microinyecciones de pronúcleos.

(A) Ovocito antes de la inyección. El pronúcleo masculino es claramente visible. (B) Ovocito tras la inyección. El pronúcleo masculino está claramente alargado, lo que demuestra el éxito de la inyección.

Figura 7: Selección de fundadores.

Se muestra el resultado de la PCR para los últimos 19 cachorros nacidos. Se realizó la PCR con los cebadores CAG-Pr-F1/GX1675-TOR1-FF (PCR de transgén; 1,6 kb) y con el par de cebadores BGH-F1/CAG-Pr-R2 (PCR de cabeza a cola; 0,8 kb) con ADN genómico de la generación F0. El control positivo (+) para la PCR de transgén era el plásmido pTG-CAG-mQC, diluido con ADN genómico de tipo natural. Se confirmó la calidad del ADN mediante una PCR de control que amplificó una señal de tipo natural de 431 pb. El control positivo (TG) para la PCR de cabeza a cola era el ADN genómico de una línea transgénica con las mismas secuencias señal de poli A-promotor que dieron lugar a un producto de PCR de 1,3 kb. El control negativo era ADN de tipo natural (WT). Como control negativo adicional se usó H₂O (Ø). M: marcador de tamaño molecular de ADN de 100 pb (New England Biolabs, NEB).

Figura 8: Genotipado de la generación F1.

Se muestra como ejemplo el resultado de la PCR de 17 cachorros. Se realizó la PCR con los cebadores CAG-Pr-F1/GX1675-TOR1-FF (PCR de transgén; 1,6 kb) con ADN genómico de la generación F1. El control positivo (+) para la PCR de transgén era el plásmido pTG-CAG-mQC, diluido con ADN genómico de tipo natural. El control negativo era ADN de tipo natural (WT). Como control negativo adicional, se usó H₂O (Ø). M1: marcador de tamaño molecular de ADN de 100 pb (NEB).

Figura 9

9A: Curva patrón de piroglutamyl-beta-naftilamina, preparada usando un sistema de HPLC Merck-Hitachi L-6210 equipado con una columna Merck RP18-LiChrocart 125-4. Se detectó el compuesto mediante absorción a 280 nm.

9B: Determinación de la actividad de QC en tejido cerebral de un ratón transgénico para QC (por triplicado, flecha izquierda) y compañeros de camada de tipo natural (por triplicado, flecha derecha) mediante detección por HPLC de piroglutamyl-beta-naftilamina como producto de la ciclación mediada por QC de glutaminil-beta-naftilamina. Las pendientes de las curvas de regresión corresponden a la velocidad inicial de la formación de producto catalizado por QC. Antes de la representación gráfica, las unidades de área (lectura de HPLC) se convirtieron en una concentración una curva patrón de piroglutamyl-beta-naftilamina.

Figura 10: Evaluación del transcrito de QC usando PCR y PCR en tiempo real

10A: Actividad de QC en plasma con EDTA, hígado y cerebro en referencia al volumen (plasma) o peso húmedo (tejido), determinada mediante cuantificación de piroglutamyl-beta-naftilamina usando HPLC.

10B: Actividad de QC en plasma con EDTA, hígado y cerebro en referencia al contenido en proteína.

10C: PCR cualitativa de QC de ratón a partir de ADNc generado de cerebro (a), hígado (b) y riñón (c) de dos ratones transgénicos para QC (QC) y controles (WT).

10D: RT-PCR en tiempo real cuantitativa usando ADNc de cerebro, hígado y riñón de ratones transgénicos para QC (QC, N=2) y ratones control (WT, N=2) como molde.

Figura 11: Actividad de QC en homogeneizado de cerebro de un ratón transgénico (línea hQC 53 n.º 27, cuadrados) y un compañero de camada no transgénico (línea hQC 53 n.º 25, círculos). Se determinó la actividad usando un ensayo, que se basa en la detección y cuantificación de piroglutamyl-beta-naftilamina usando HPLC. La pendiente más alta en el caso del animal transgénico demuestra la expresión del transgén (QC humana).

Figura 12: Actividad de QC en homogeneizado de cerebro de un ratón transgénico (línea hQC 53 n.º 27, cuadrados) y un compañero de camada no transgénico (línea hQC 53 n.º 25, círculos). Se determinó la actividad usando un ensayo, que se basa en la detección fluorométrica de la actividad de QC. La pendiente más alta en el caso del animal transgénico demuestra la expresión del transgén QC.

Figura 13: Comparación de la actividad de QC en los homogeneizados de cerebro de ratones transgénicos que expresan QC humana dirigida específicamente a neuronas por el promotor Thy-1 (línea 53, línea 37 y línea 43) o QC murina de manera ubicua (pbd17E3). A) Comparación de la actividad de QC en muestras de cerebro de animales de diferentes líneas fundadoras. Obviamente, sólo los animales transgénicos hQC presentaron actividad de QC significativa, no los compañeros de camada no transgénicos, lo que demuestra que el transgén media el aumento de la actividad de QC. B) Basándose en estos resultados, se seleccionó la línea 53 fundadora transgénica para QC humana, que presenta la máxima actividad de QC en la muestra de cerebro.

Figura 14: Análisis por inmunotransferencia de tipo Western de homogeneizados de cerebro de diferentes animales transgénicos. Se usó un anticuerpo policlonal primario, que detectaba QC humana y murina. Los resultados reflejan el análisis de la actividad de QC de manera exacta. Se obtuvo la máxima inmunoreactividad de QC en animales transgénicos de la línea 53. Sólo se observó una ligera tinción en ratones pbd17E3. La migración de QC se muestra mediante el control positivo, QC humana recombinante. Líneas: 1: proteínas patrón, 2: línea hQC 53 n.º 23 (tg, femenina), 3: línea hQC 53 n.º 25 (ntg, femenina), 4: línea hQC 53 n.º 27 (tg, femenina), 5: línea hQC 37 n.º 43 (tg, femenina), 6: línea hQC 37 n.º 43 n.º 34 (ntg, masculina), 7: línea hQC 37 n.º 43 n.º 57 (tg, femenina), 8: línea hQC 43 n.º 31 (tg, femenina), 9: línea hQC 43 n.º 36 (ntg, masculina), 10: línea hQC 43 n.º 32 (tg, masculina), 11: hQC, control positivo [40 ng], líneas 12-15: PBD17E3 12: n.º 7936 tg, 13: n.º 8860 tg, 14: n.º 8862 tg, 15: n.º 8863 tg

Figura 15: Representación esquemática del plásmido usado para la generación de ratones transgénicos que sobreexpresan QC humana específica de neuronas.

Figura 16: Digestión por restricción analítica del vector de plásmido generado. Se usó el fragmento con un tamaño de 7929 para la microinyección. Carriles: 1, Hind III - marcador de tamaño molecular; 2, pUC18-mThy1-hQC / Not I / Pvu I (7929 pb + 1443 pb + 896 pb); 3, Pst I - marcador de tamaño molecular; 4, PCR: pUC18-mThyl-hQC 27 ng (1316 pb); 5, PCR: pUC18-mThyl-hQC 27 ng + 100 ng de ADNg (1316 pb); 6, PCR: 100 ng de ADNg; 7, PCR: control sin molde; 8, marcador de tamaño molecular de 1 kb.

Figura 17: Determinación cuantitativa de los niveles de transcrito de QC humana (PCR en tiempo real) de tres líneas fundadoras diferentes. Los niveles se representan como valores relativos en comparación con un patrón, GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Se determinaron los niveles de transcrito máximos con la línea 53, que también presentaba la máxima actividad de QC.

Otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes tras la consideración de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende métodos y composiciones para la generación de un modelo de animal transgénico para el estudio de enfermedades relacionadas con glutaminil ciclasa y el animal transgénico no humano *per se*. La presente invención comprende específicamente métodos y composiciones para generar un modelo de animal transgénico que sobreexpresa la enzima glutaminil-péptido ciclotransferasa (Qpct) y el animal transgénico no humano *per se*. La presente invención comprende además métodos y composiciones para someter a prueba promotores e inhibidores de Qpct.

Los extremos N-terminales de los péptidos β amiloides depositados en cerebro con síndrome de Down y la enfermedad de Alzheimer, y los péptidos amiloides ADan y ABri depositados en la demencia danesa familiar y la demencia británica familiar también, llevan ácido piroglutámico. La formación de pGlu es un acontecimiento importante en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, puesto que los péptidos de β amiloides modificados ADan y ABri muestran una tendencia potenciada a la agregación de amiloide y toxicidad, empeorando probablemente la aparición y progresión de la enfermedad. (Russo, C. *et al.* 2002 J Neurochem 82, 1480-1489; Ghiso, J. *et al.* 2001 Amyloid 8, 277-284).

En cambio, en los péptidos de A β naturales (3-40/42), está presente ácido glutámico como aminoácido N-terminal.

Definiciones

El término "transgén" significa un segmento de ADN que se ha incorporado en el genoma huésped o que puede replicarse de manera autónoma en una célula huésped y puede provocar la expresión de uno o más productos celulares. Transgenes a modo de ejemplo dotarán a la célula huésped, o los animales desarrollados a partir de la misma, de un fenotipo novedoso en relación con el animal o célula no transformada correspondiente.

La expresión "animal transgénico" significa un animal no humano, habitualmente un mamífero, que tiene una

secuencia de ácido nucleico no endógena presente como un elemento extracromosómico en una parte de sus células o integrado de manera estable en su ADN de la línea germinal.

El término “constructo” significa un ácido nucleico recombinante, generalmente ADN recombinante, que se ha generado para el fin de la expresión de una(s) secuencia(s) de nucleótidos específica(s), o que va a usarse en la construcción de otras secuencias de nucleótidos recombinantes. El ácido nucleico recombinante puede codificar por ejemplo para un polipéptido quimérico o humanizado.

Polipéptido en el presente documento se refiere a todas las posibles secuencias de aminoácidos que comprenden más de 10 aminoácidos.

La expresión “operativamente unido” significa que una secuencia de ADN y una(s) secuencia(s) reguladora(s) están conectadas de tal manera que permite la expresión génica cuando se unen las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras transcripcionales) a la(s) secuencia(s) reguladora(s).

La expresión “operativamente insertado” significa que una secuencia de nucleótidos de interés está colocada adyacente a una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción y traducción de la secuencia de nucleótidos de interés introducida.

Transgenes

Los polinucleótidos de glutaminil ciclasa que comprenden el transgén de la presente invención incluyen ADNc de glutaminil ciclasa e incluirán también ADNc de glutaminil ciclasa modificado. Tal como se usa en el presente documento, una “modificación” de un ácido nucleico puede incluir una o varias adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos con respecto a una secuencia de referencia. Una modificación de un ácido nucleico puede incluir sustituciones que no cambian la secuencia de aminoácidos codificada debido a la degeneración del código genético, o que dan como resultado una sustitución conservativa. Tales modificaciones pueden corresponder a variaciones que se hacen deliberadamente, tales como la adición de una cola de poli A, o variaciones que se producen como mutaciones durante la replicación del ácido nucleico.

Tal como se emplea en el presente documento, la expresión “sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos” se refiere a ADN que tiene una identidad suficiente con el polinucleótido de referencia, de manera que hibridará con el nucleótido de referencia en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas o altamente rigurosas. El ADN que tiene “sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos” que la secuencia de nucleótidos de referencia puede tener una identidad que oscila entre al menos el 60% y al menos el 95% con respecto a la secuencia de nucleótidos de referencia.

La frase “hibridación moderadamente rigurosa” se refiere a condiciones que permiten que un ácido nucleico diana se una a un ácido nucleico complementario. Los ácidos nucleicos hibridados tendrán generalmente una identidad dentro de un intervalo de al menos aproximadamente el 60% a al menos aproximadamente el 95%. Condiciones moderadamente rigurosas son condiciones equivalentes a hibridación en formamida al 50%, 5x disolución de Denhart, 5x tampón EDTA-fosfato de sodio-solución salina (SSPE), SDS al 0,2% (Aldrich) a aproximadamente 42°C, seguido por lavado en 0,2x SSPE, SDS al 0,2% (Aldrich), a aproximadamente 42°C.

Hibridación de alta rigurosidad se refiere a condiciones que permiten la hibridación de sólo aquellas secuencias de ácido nucleico que forman híbridos estables en NaCl 0,018 M a aproximadamente 65°C, por ejemplo, si un híbrido no es estable en NaCl 0,018 M a aproximadamente 65°C, no será estable en condiciones de alta rigurosidad, tal como se contempla en el presente documento. Pueden proporcionarse condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo, mediante hibridación en formamida al 50%, 5x disolución de Denhart, 5x SSPE, SDS al 0,2% a aproximadamente 42°C, seguido por lavado en 0,1x SSPE y SDS al 0,1% a aproximadamente 65°C.

Los expertos en la técnica conocen bien otros tampones y condiciones de hibridación de moderada rigurosidad y alta rigurosidad adecuados y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); y Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology (suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999)).

La secuencia de aminoácidos codificada por el transgén de la presente invención puede ser una secuencia de glutaminil ciclasa de un ser humano o el homólogo de glutaminil ciclasa de cualquier especie, preferiblemente de una especie murina. La secuencia de aminoácidos codificada por el transgén de la presente invención también puede ser un fragmento de la secuencia de aminoácidos de glutaminil ciclasa siempre que el fragmento conserve parte o toda la función de la secuencia de glutaminil ciclasa de longitud completa. La secuencia también puede ser una secuencia de glutaminil ciclasa modificada. Sustituciones, deleciones o adiciones individuales, que alteran, añaden o delecionan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (normalmente menos del 10%, más normalmente menos del 5% y todavía más normalmente menos del 1%.) Una “modificación” de la secuencia de aminoácidos abarca sustituciones conservativas de la secuencia de aminoácidos. Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Se incluyen otras modificaciones menores dentro de la secuencia siempre que el polipéptido conserve algunas o todas las características estructurales y/o funcionales de un polipéptido de glutaminil ciclasa. Las características estructurales o funcionales a modo de ejemplo incluyen identidad de secuencia o similitud sustancial, reactividad con anticuerpos, la presencia de dominios estructurales conservados tales como dominios de unión a ARN o dominios ácidos.

Vectores y constructos de ADN

La invención proporciona además un constructo de ADN que comprende el transgén de glutaminil ciclasa tal como se describió anteriormente. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "constructo de ADN" se refiere a una disposición específica de elementos genéticos en una molécula de ADN. Además de glutaminil ciclasa humana, o formas mutantes de la misma, la invención también proporciona un constructo de ADN usando polipéptidos de otras especies así como mamíferos no humanos mutantes para glutaminil ciclasa que expresan BACE1 de especies no humanas.

Si se desea, los constructos de ADN pueden diseñarse para que estén operativamente unidos a elementos de expresión apropiados tales como promotores o potenciadores para permitir la expresión de un elemento genético en el constructo de ADN en un tejido o célula apropiada. El uso del mecanismo de control de la expresión permite la expresión y administración dirigida del gen de interés. Por ejemplo, los constructos de la presente invención pueden construirse usando un casete de expresión que incluye en la dirección 5'-3' de transcripción una región de iniciación de la transcripción y la traducción asociada con expresión génica en tejido cerebral, ADN que codifica para una proteína glutaminil ciclasa de tipo natural o mutante y una región de terminación de la transcripción y traducción funcional en el animal huésped. También puede estar presente uno o más intrones. La región de iniciación de la transcripción puede ser endógena para el animal huésped o foránea o exógena para el animal huésped.

Los constructos de ADN descritos en el presente documento pueden incorporarse en vectores para la propagación o transfección en células apropiadas para generar mamíferos no humanos mutantes que sobreexpresan glutaminil ciclasa y también están comprendidos por la presente invención. Un experto en la técnica puede seleccionar un vector basándose en propiedades deseadas, por ejemplo, para la producción de un vector en una célula particular tal como una célula bacteriana o una célula de mamífero.

Los vectores pueden contener un elemento regulador que proporciona expresión inducible o específica de tejido de un ácido nucleico operativamente unido. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un potenciador o promotor específico de tejido apropiado que permita la expresión de polipéptidos de glutaminil ciclasa en un tejido deseado. Debe indicarse que la expresión específica de tejido tal como se describe en el presente documento no requiere una ausencia completa de expresión en tejidos distintos del tejido preferido. En su lugar, expresión "específica de célula" o "específica de tejido" se refiere a una mayoría de la expresión de un gen particular de interés en el tejido o tipo celular preferido.

Puede incluirse también cualquiera de una variedad de potenciadores o promotores inducibles en el vector para la expresión de un polipéptido o ácido nucleico de glutaminil ciclasa que puede regularse. Tales sistemas inducibles incluyen, por ejemplo, el sistema inducible por tetraciclina (Gossen & Bizard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992); Gossen *et al.*, Science, 268:17664769 (1995); Clontech, Palo Alto, Calif.); el promotor de metalotioneína inducido por metales pesados; hormona esteroide de insectos sensible a ecdisona o esteroides relacionados tales como muristerona (No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351 (1996); Yao *et al.*, Nature, 366:476-479 (1993); Invitrogen, Carlsbad, Calif.); virus de tumor mamario de ratón (VTMR) inducido por esteroides tales como glucocorticoide y estrógeno (Lee *et al.*, Nature, 294:228-232 (1981); y promotores de choque térmico inducibles por cambios de temperatura; el promotor del gen de la enolasa específico de neuronas de ratas (Forss-Petter, *et al.*, Neuron 5: 197-197 (1990)); el promotor del gen de β -actina humana (Ray, *et al.*, Genes and Development (1991) 5:2265-2273); el promotor del gen de la cadena del factor B de crecimiento derivado de las plaquetas humano (PDGF-B) (Sasahara, *et al.*, Cell (1991) 64:217-227); el promotor del gen de canal de sodio de rata (Maue, *et al.*, Neuron (1990) 4:223-231); el promotor del gen de la superóxido dismutasa de cobre-zinc humana (Ceballos-Picot, *et al.*, Brain Res. (1991) 552:198-214); y promotores para miembros de la familia de genes reguladores de POU-dominio de mamíferos (Xi *et al.*, (1989) Nature 340:35-42).

Los elementos reguladores, incluyendo promotores o potenciadores, pueden ser constitutivos o estar regulados,

dependiendo de la naturaleza de la regulación, y pueden regularse en una variedad de tejidos, o uno o unos cuantos tejidos específicos. Las secuencias reguladoras o los elementos reguladores están operativamente unidos a una de las secuencias de polinucleótido de la invención de manera que la relación física y funcional entre la secuencia de polinucleótido y la secuencia reguladora permite la transcripción de la secuencia de polinucleótido. Los vectores útiles para la expresión en células eucariotas pueden incluir, por ejemplo, elementos reguladores incluyendo el promotor CAG, el promotor temprano de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor inducible por esteroides del virus de tumor mamario de ratón (VTMR), Pgtf, el promotor del virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM), el promotor thy-1 y similares.

Si se desea, el vector puede contener un marcador seleccionable. Tal como se usa en el presente documento, un "marcador seleccionable" se refiere a un elemento genético que proporciona un fenotipo seleccionable a una célula en la que se ha introducido el marcador seleccionable. Un marcador seleccionable es generalmente un gen cuyo producto génico proporciona resistencia frente a un agente que inhibe el crecimiento celular o destruye una célula. Puede usarse una variedad de marcadores seleccionables en los constructos de ADN de la invención, incluyendo, por ejemplo, los genes Neo, Hyg, hisD, Gpt y Ble, tal como se describe, por ejemplo en Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology (suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999)) y la patente estadounidense n.º 5.981.830. Los fármacos útiles para seleccionar la presencia de un marcador seleccionable incluyen, por ejemplo, G418 para Neo, higromicina para Hyg, histidinol para hisD, xantina para Gpt y bleomicina para Ble (véase Ausubel *et al.*, citado anteriormente, (1999); patente estadounidense n.º 5.981.830). Los constructos de ADN de la invención pueden incorporar un marcador seleccionable positivo, un marcador seleccionable negativo o ambos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.981.830).

Animales transgénicos no humanos

La invención proporciona principalmente un animal transgénico no humano cuyo genoma comprende un transgén que codifica para un polipéptido de glutaminil ciclasa. El fragmento de ADN puede integrarse en el genoma de un animal transgénico mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. La molécula de ADN que contiene la secuencia génica deseada puede introducirse en células pluripotentes, tales como células ES, mediante cualquier método que permita que la molécula introducida experimente recombinación en sus regiones de homología. Las técnicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, coprecipitados de fosfato de calcio / ADN, microinyección de ADN en el núcleo, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, transfección y policones (por ejemplo, polibreno, poliornitina, etc.) El ADN puede ser ADN mono o bicatenario, lineal o circular. (Véanse por ejemplo, Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1986); Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, segunda ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1994), las patentes estadounidenses n.ºs 5.602.299; 5.175.384; 6.066.778; 4.873.191 y 6.037.521; transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152 (1985)); direccionamiento génico en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56:313-321 (1989)); electroporación de embriones (Lo, Mol Cell. Biol. 3:1803-1814 (1983)); y transferencia génica mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, Cell 57:717-723 (1989)).

Por ejemplo, el cigoto es una buena diana para la microinyección, y se conocen bien métodos de microinyección de cigotos (véase el documento US 4.873.191).

Pueden usarse también células embrionarias en diversos estados de desarrollo para introducir transgenes para la producción de animales transgénicos. Se usan diferentes métodos dependiendo de la fase de desarrollo de la célula embrionaria. Tales células madre embrionarias (ES) transfectadas pueden colonizar después un embrión tras su introducción en el blastocelo de un embrión en fase de blastocisto y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante (revisado en Jaenisch, Science 240:1468-1474 (1988)). Antes de la introducción de células ES transfectadas en el blastocelo, las células ES transfectadas pueden someterse a diversos protocolos de selección para enriquecer la proporción de células ES que han integrado el transgén si el transgén proporciona un medio para tal selección. Alternativamente, puede usarse PCR para seleccionar células ES que han integrado el transgén.

Además, también puede usarse infección retroviral para introducir transgenes en un animal no humano. El embrión no humano en desarrollo puede cultivarse *in vitro* hasta la fase de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la infección retroviral (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260-1264 (1976)). Se obtiene una infección eficaz de los blastómeros mediante tratamiento enzimático para eliminar la zona pelúcida (Hogan *et al.*, citado anteriormente, 1986). El sistema de vector viral usado para introducir el transgén es normalmente un retrovirus de replicación defectuosa que porta el transgén (Jahner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927-6931 (1985); Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152 (1985)). La transfección se obtiene fácil y eficazmente cultivando los blastómeros sobre una monocapa de células que producen virus (Van der Putten, citado anteriormente, 1985; Stewart *et al.*, EMBO J. 6:383-388 (1987)). Alternativamente, la infección puede realizarse en una fase posterior. Pueden inyectarse virus o células que producen virus en el blastocelo (Jahner D. *et al.*, Nature 298:623-628 (1982)). La mayoría de los fundadores serán un mosaico para el transgén puesto que la incorporación se produce sólo en un subconjunto de células, que forman el animal transgénico. Además, el fundador puede contener diversas inserciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones en el genoma, que generalmente se segregarán en la descendencia. Además, pueden introducirse transgenes en la línea germinal mediante infección retroviral intrauterina del embrión en gestación media (Jahner *et al.*, citado anteriormente, 1982).

Medios adicionales de uso de retrovirus o vectores retrovirales para crear animales transgénicos conocidos por los expertos en la técnica implican la microinyección de partículas retrovirales o células tratadas con mitomicina C que producen retrovirus en el espacio perivitelino de huevos fertilizados o embriones tempranos (documento WO 90/08832 (1990); Haskell y Bowen, *Mal. Reprod. Dev.* 40:386 (1995)).

- 5 Cualquier otra tecnología para introducir transgenes en un animal no humano, por ejemplo la activación o las tecnologías de rescate pueden usarse también para solucionar el problema de la presente invención. La tecnología de activación se conoce bien en la técnica tal como se describe por ejemplo en Casas *et al.* (2004) *Am J Pathol* 165, 1289-1300.

- 10 Una vez producidos los animales fundadores, pueden criarse, criarse de manera consanguínea, criarse de manera no consanguínea o criarse de manera cruzada para producir colonias del animal particular. Los ejemplos de tales estrategias de cría incluyen, pero no se limitan a: cría de manera no consanguínea de animales fundadores con más de un sitio de integración con el fin de establecer líneas separadas; cría de manera consanguínea de líneas separadas con el fin de producir transgénicos compuestos que expresan el transgén a niveles superiores debido a los efectos de la expresión aditiva de cada transgén; cruce de ratones transgénicos heterocigotos para producir ratones homocigotos para un sitio de integración dado con el fin de tanto aumentar la expresión como eliminar la necesidad de seleccionar animales mediante análisis del ADN; cruce de líneas homocigotas separadas para producir líneas homocigotas o heterocigotas compuestas; cría de animales para producir diferentes antecedentes genéticos consanguíneos de modo que se examinen los efectos de la modificación de alelos sobre la expresión del transgén y los efectos de la expresión.

- 20 Los animales transgénicos se examinan y evalúan para seleccionar aquellos animales que tienen el fenotipo de interés. La selección inicial puede realizarse usando, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo Southern o técnicas de PCR para analizar tejidos animales para verificar que la integración del transgén ha tenido lugar. El nivel de expresión de ARNm del transgén en los tejidos de los animales transgénicos puede evaluarse también usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia de tipo Northern de muestras de tejido obtenidas del animal, análisis de hibridación *in situ* y PCR con transcriptasa inversa (rt-PCR). Pueden evaluarse muestras de los tejidos adecuados inmunocitoquímicamente usando anticuerpos específicos para glutaminil ciclasa o con una etiqueta tal como EGFP. Los mamíferos no humanos transgénicos pueden caracterizarse adicionalmente para identificar aquellos animales que tienen un fenotipo útil en los métodos de la invención. En particular, pueden seleccionarse mamíferos no humanos transgénicos que sobreexpresan glutaminil ciclasa usando los métodos dados a conocer en el presente documento. Por ejemplo, pueden observarse secciones de tejido bajo un microscopio fluorescente para determinar el colorante presente de fluorescencia, que indica la presencia del gen indicador.

- 25 Otro método para afectar a la expresión específica de tejido de la proteína glutaminil ciclasa es a través del uso de promotores específicos de tejido. Los ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert *et al.*, (1987) *Genes Dev.* 1:268-277); promotores específicos linfoides (Calame y Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji *et al.*, (1983) *Cell* 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), promotores neuroespecíficos (por ejemplo, el promotor del neurofilamento, el promotor de Thy-1 o el promotor de la proteína Bri; Sturchler-Pierrat *et al.*, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13287-13292, Byrne y Ruddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund *et al.*, (1985) *Science* 230:912-916), expresión específica cardíaca (promotor de la cadena pesada de alfa miosina, Subramaniam, A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, y Robbins J. Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266: 24613-24620, 1991.) y promotores específicos de glándulas mamarias (por ejemplo, promotor de suero lácteo; patente estadounidense n.º 4.873.316 y publicación de solicitud europea n.º 264.166).

- 45 La invención proporciona además una célula aislada que contiene un constructo de ADN de la invención. El constructo de ADN puede introducirse en una célula mediante cualquiera de los métodos de transfección bien conocidos (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); Ausubel *et al.*, citado anteriormente, (1999)). Alternativamente, la célula puede obtenerse aislando una célula de un mamífero no humano mutante creado tal como se describe en el presente documento. Por tanto, la invención proporciona una célula aislada a partir de un mamífero no humano mutante para glutaminil ciclasa de la invención, en particular, un ratón mutante para glutaminil ciclasa. Las células pueden obtenerse a partir de un mamífero no humano mutante para glutaminil ciclasa homocigoto tal como un ratón o un mamífero no humano mutante para glutaminil ciclasa heterocigoto tal como un ratón.

Efectores

- 55 Los efectores, tal como se usa el término en el presente documento, se definen como moléculas que se unen a enzimas y aumentan ($\hat{=}$ promueven) o disminuyen ($\hat{=}$ inhiben) su actividad *in vitro* y/o *in vivo*. Algunas enzimas tienen sitios de unión para moléculas que afectan a su actividad catalítica; una molécula estimuladora se denomina activador. Las enzimas pueden tener incluso múltiples sitios para reconocer más de un activador o inhibidor. Las enzimas pueden detectar concentraciones de una variedad de moléculas y usar esa información para variar sus

propias actividades.

- 5 Los efectores pueden modular la actividad enzimática porque las enzimas pueden adoptar conformaciones tanto activas como inactivas: los activadores son efectores positivos, los inhibidores son efectores negativos. Los efectores actúan no sólo en los sitios activos de las enzimas, sino también en sitios reguladores, o sitios alostéricos, términos usados para enfatizar que el sitio regulador es un elemento de la enzima distinto del sitio catalítico y para diferenciar esta forma de regulación de la competición entre sustratos e inhibidores en el sitio catalítico (Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. 1990, Molecular Cell Biology 2ª edición, Scientific American Books, Nueva York, página 63).

Péptidos

- 10 Si se mencionan péptidos o aminoácidos en la presente invención, cada residuo de aminoácido está representado por una designación de una letra o una de tres letras, correspondiente al nombre trivial del aminoácido, según la siguiente lista convencional:

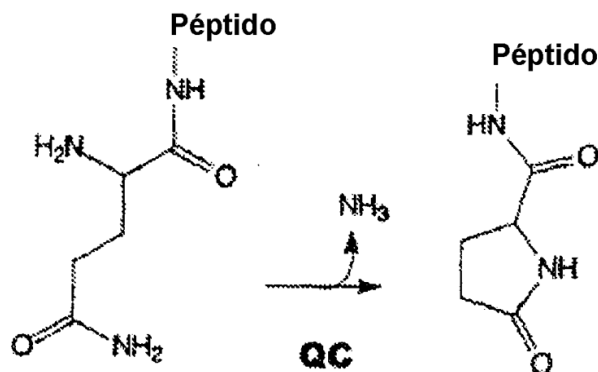
<u>Aminoácido</u>	<u>Símbolo de una letra</u>	<u>Símbolo de tres letras</u>
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

QC

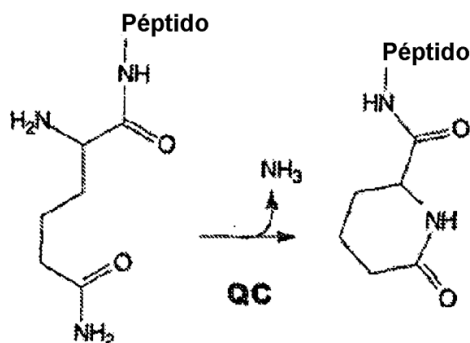
- 15 Los términos "QC" o "Qpct" tal como se usan en el presente documento pretenden referirse ambos a lo mismo y comprenden glutaminil ciclasa (QC), es decir glutaminil-péptido ciclotransferasa (EC 2.3.2.5.) y enzimas similares a QC. QC y enzimas similares a QC tienen actividad enzimática idéntica o similar, definida adicionalmente como actividad de QC. En este sentido, las enzimas similares a QC pueden diferir fundamentalmente en su estructura molecular de QC.
- 20 La expresión "actividad de QC" tal como se usa en el presente documento se define como la ciclación intramolecular de residuos de glutamina N-terminales para dar ácido piroglutámico (pGlu*) o de L-homoglutamina o L-β-homoglutamina N-terminal para dar un derivado de piro-homoglutamina cíclico con liberación de amoníaco. Véanse

los esquemas 1 y 2.

Esquema 1: Ciclación de glutamina mediante QC



Esquema 2: Ciclación de L-homoglutamina mediante QC



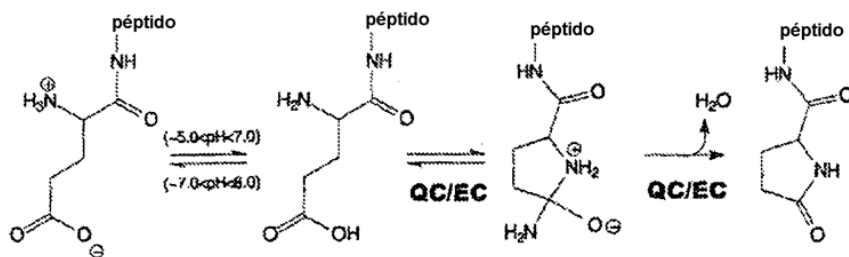
5

El término "EC" tal como se usa en el presente documento comprende la actividad secundaria de QC y enzimas similares a QC como glutamato ciclase (EC), definida adicionalmente como actividad EC.

La expresión "actividad EC" tal como se usa en el presente documento se define como la ciclación intramolecular de residuos de glutamato N-terminales para dar ácido piroglutámico (pGlu*) mediante QC. Véase el esquema 3.

- 10 La expresión "enzima dependiente de metal" tal como se usa en el presente documento se define como enzima(s) que requiere(n) un ion metálico unido con el fin de cumplir su función catalítica y/o requiere(n) un ión metálico unido con el fin de formar la estructura catalíticamente activa.

Esquema 3: Ciclación N-terminal de péptidos de glutamilo mediante QC (EC)



- 15 La expresión "enfermedad relacionada con glutaminil ciclase" tal como se usa en el presente documento se refiere a todas aquellas enfermedades, trastornos o estados que están modulados por la glutaminil ciclase.

Ensayos e identificación de agentes terapéuticos

- 20 Los métodos de la presente invención son particularmente útiles en la evaluación de efectores de glutaminil ciclase y para el desarrollo de fármacos y agentes terapéuticos para el tratamiento y la prevención de enfermedades asociadas con amiloide tales como deterioro cognitivo leve, enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración en

síndrome de Down, demencia danesa familiar y demencia británica familiar.

El animal transgénico o las células del animal transgénico de la invención pueden usarse en una variedad de ensayos de selección. Por ejemplo, puede seleccionarse cualquiera de una variedad de posibles agentes que se sospecha que afectan a la glutaminil ciclasa y a la acumulación de amiloide, así como los agentes terapéuticos bloqueantes y antagonistas apropiados, evaluando el efecto de agentes de prueba ya administrados sobre la función y el fenotipo de las células y sobre el fenotipo (neurológico) de los animales transgénicos.

También pueden usarse estudios del comportamiento para someter a prueba posibles agentes terapéuticos, tales como los estudios diseñados para evaluar las habilidades motoras, los déficits de aprendizaje y memoria. Un ejemplo de una prueba de este tipo es el laberinto de agua de Morris (Morris (1981) *Learn Motiv* 12:239-260). Adicionalmente, los estudios del comportamiento pueden incluir evaluaciones de la actividad locomotora tal como el rotor-varilla y el campo abierto.

En una realización preferida, la invención proporciona un método para seleccionar agentes biológicamente activos que inhiben o promueven la producción de glutaminil ciclasa *in vivo*, que comprende determinar el efecto de un agente de prueba ya administrado sobre la cantidad de glutaminil ciclasa producida en los animales transgénicos no humanos de la invención.

En una realización preferida adicional, la invención proporciona un método para seleccionar agentes terapéuticos que inhiben o promueven la actividad glutaminil ciclasa que comprende

(a) evaluar los efectos de agentes de prueba ya administrados sobre el fenotipo neurológico del ratón de la invención, y

(b) seleccionar un agente de prueba que inhibe o promueve la actividad glutaminil ciclasa.

Los métodos de la invención pueden usar ventajosamente células aisladas de un mamífero no humano mutante para glutaminil ciclasa homocigoto o heterocigoto, para estudiar la acumulación de amiloide así como para someter a prueba posibles compuestos terapéuticos. Los métodos de la invención pueden usarse también con células que expresan glutaminil ciclasa tal como una línea celular transfectada.

Puede usarse una célula que sobreexpresa glutaminil ciclasa en un método *in vitro* para seleccionar compuestos como posibles agentes terapéuticos para tratar enfermedades asociadas a A β . En un método de este tipo, se pone en contacto un compuesto con una célula que sobreexpresa glutaminil ciclasa, una célula transfectada o una célula derivada de un animal no humano mutante para glutaminil ciclasa, y se examina para determinar alteraciones en un fenotipo asociado con expresión de glutaminil ciclasa. Los cambios en la producción de A β en el ensayo celular y el animal transgénico pueden evaluarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Un polipéptido de fusión de glutaminil ciclasa tal como glutaminil ciclasa puede ser particularmente útil para tales métodos de selección puesto que la expresión de glutaminil ciclasa puede monitorizarse mediante la intensidad de fluorescencia. Otros polipéptidos de fusión a modo de ejemplo incluyen otras proteínas fluorescentes, o modificaciones de las mismas, glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa, poli His y similares, o cualquier tipo de etiqueta de epítipo. Tales polipéptidos de fusión pueden detectarse, por ejemplo, usando anticuerpos específicos frente a los polipéptidos de fusión. Los polipéptidos de fusión pueden ser un polipéptido completo o una parte funcional del mismo siempre que la parte funcional conserve propiedades deseadas, por ejemplo, actividad de unión a anticuerpos o actividad de fluorescencia.

La invención proporciona además un método de identificación de un posible agente terapéutico para su uso en el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente. El método incluye las etapas de poner en contacto una célula que contiene un constructo de ADN que comprende polinucleótidos que codifican para un polipéptido de glutaminil ciclasa con un compuesto y examinar la célula para detectar una disminución de la producción de glutaminil ciclasa, identificando de ese modo un posible agente terapéutico para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con glutaminil ciclasa. La célula puede aislarse de un mamífero no humano transgénico que tiene células nucleadas que contienen el constructo de ADN de glutaminil ciclasa. Alternativamente, la célula puede contener un constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica para una fusión de proteína fluorescente verde, u otro polipéptido de fusión, con un polipéptido de glutaminil ciclasa.

Adicionalmente, pueden usarse células que expresan un polipéptido de glutaminil ciclasa en una selección preliminar para identificar compuestos como posibles agentes terapéuticos que tienen una actividad que altera un fenotipo asociado con la expresión de glutaminil ciclasa. Como con selecciones *in vivo* usando mamíferos no humanos mutantes para glutaminil ciclasa, puede usarse una célula control apropiada para comparar los resultados de la selección. La eficacia de los compuestos identificados mediante una selección *in vitro* inicial usando células que expresan glutaminil ciclasa puede someterse a prueba adicionalmente *in vivo* usando los mamíferos no humanos mutantes para glutaminil ciclasa de la invención, si se desea. Por tanto, la invención proporciona métodos de selección de un gran número de compuestos usando un ensayo basado en células, por ejemplo, usando selección de alto rendimiento, así como métodos para someter a prueba adicionalmente compuestos como agentes terapéuticos en un modelo animal de trastornos relacionados con A β .

QC está implicada en la formación de ácido piroglutámico que favorece la agregación de péptidos β amiloides. Por tanto, una inhibición de QC conduce a una prevención de la precipitación del [pGlu³]A β 3-40/42/43 o [pGlu¹¹]A β 11-40/42/43 que forma placas, provocando la aparición y progresión de la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, independientemente del mecanismo mediante el que se produce la ciclación.

- 5 Se encuentra glutamato en las posiciones 3, 11 y 22 del péptido β amiloide. Entre ellas, la mutación de ácido glutámico (E) a glutamina (Q) en la posición 22 (corresponde al aminoácido 693 de la proteína precursora de amiloide APP770, entrada de Swissprot: P05067) se ha descrito como la denominada mutación de amiloidosis cerebroarterial de tipo holandés.

- 10 Se ha descrito que los péptidos de β -amiloide con un residuo de ácido piroglutámico en la posición 3, 11 y/o 22 son más citotóxicos e hidrófobos que A β 1-40/4243 (Saido T.C. 2000 Medical Hypotheses 54(3): 427-429).

Las múltiples variaciones N-terminales pueden generarse mediante la enzima β -secretasa y la enzima de escisión de proteína precursora de amiloide de sitio β (BACE) en diferentes sitios (Huse J.T. *et al.* 2002 Biol. Chem. 277 (18): 16278-16284), y/o mediante procesamiento por aminopeptidasas.

- 15 No había ninguna prueba experimental que apoyase la conversión enzimática de Glu¹-péptidos en pGlu-péptidos mediante una glutamil ciclasa desconocida (EC) (Garden, R. W., Moroz, T. P., Gleeson, J. M., Floyd, P. D., Li, L. J., Rubakhin, S. S., y Sweedler, J. V. (1999) J Neurochem 72, 676-681; Hosoda R. *et al.* (1998) J Neuropathol Exp Neurol. 57, 1089-1095). No se había identificado ninguna actividad enzimática de este tipo, que pudiese ciclar Glu¹-péptidos, que estuviesen protonados en el extremo N-terminal y tuviesen un resto de Glu¹ γ -carboxilato cargado negativamente en condiciones de pH neutro o ligeramente alcalino.

- 20 La actividad de QC frente a sustratos de Gln¹ se ve drásticamente reducida por debajo de pH 7,0. En cambio, parece que la conversión de Glu¹ puede producirse en condiciones de reacciones ácidas (por ejemplo Iwatsubo, T., Saido, T. C., Mann, D. M., Lee, V. M., y Trojanowski, J. Q. (1996) Am J Pathol 149, 1823-1830).

- 25 Anteriormente, se investigó si QC puede reconocer y recambiar péptidos derivados de β amiloide en condiciones ligeramente ácidas (documento WO 2004/098625). Por tanto, se sintetizaron e investigaron los péptidos [Gln³]A β 1-11a, A β 3-11a, [Gln³]A β 3-11a, A β 3-21a, [Gln³]A β 3-21a y [Gln³]A β 3-40 como posibles sustratos de la enzima. Se eligieron estas secuencias para imitar a los péptidos [Glu³]A β y los péptidos [Gln³]A β truncados en el extremo N-terminal y C-terminal naturales que podrían producirse debido a Glu-amidación postraduccional.

- 30 Se mostró que QC humana y de papaya catalizan la ciclación tanto de glutaminilo como de glutamilo. Aparentemente, la función fisiológica primaria de QC es finalizar la maduración hormonal en células endocrinas mediante ciclación de glutamina antes o durante el proceso de secreción de hormonas. Se sabe que tales vesículas secretoras tienen un pH ácido. Por tanto, una actividad secundaria de la enzima en el intervalo de pH estrecho desde 5,0 hasta 7,0 podría ser su actividad glutamil ciclasa recién descubierta, que cicla también péptidos de Glu-A β . Sin embargo, debido a que la ciclación de Glu se produce mucho más lentamente en comparación con la conversión de Gln, es cuestionable si la ciclación de glutamino desempeña un papel fisiológico significativo. Sin embargo, en la patología de los trastornos neurodegenerativos, la ciclación de glutamilo es de relevancia.

- 35 Al investigar la dependencia del pH de esta reacción enzimática, se ha mostrado que el extremo N-terminal no protonado era esencial para la ciclación de Gln¹-péptidos y por consiguiente que el valor de pKa del sustrato era idéntico al valor de pKa para la catálisis de QC. Por tanto, QC estabiliza el ataque nucleófilo intramolecular del resto de α -amino no protonado sobre el carbono γ -carbonilo.

- 40 En contraposición a la carga monovalente presente en péptidos que contienen glutamina N-terminal, el residuo de Glu N-terminal en péptidos que contienen Glu está predominantemente cargado de manera bivalente a pH neutro. El glutamato presenta valores de pKa de aproximadamente 4,2 y 7,5 para el resto γ -carboxílico y para el resto de α -amino, respectivamente, es decir, a pH neutro y por encima, aunque el nitrógeno de α -amino está en parte o completamente no protonado y es nucleófilo, el grupo γ -carboxílico no está protonado, y así no ejerce actividad de carbonilo electrófilo. Por tanto, la ciclación intramolecular es imposible.

- 45 Sin embargo, en el intervalo de pH de aproximadamente 5,2-6,5, entre sus valores de pKa respectivos, los dos grupos funcionales están presentes ambos en formas no ionizadas, en concentraciones de aproximadamente el 1-10% (-NH₂) o el 10-1% (-COOH) de péptido que contiene Glu N-terminal total. Como resultado, a lo largo de un intervalo de pH ligeramente ácido, están presentes especies de Glu-péptidos N-terminales que portan ambos grupos no cargados y, por tanto, es posible que QC establezca el producto intermedio de ciclación intramolecular para dar el pGlu-péptido, es decir, si el grupo γ -carboxílico está protonado, el carbono carbonilo es lo suficientemente electrófilo para permitir el ataque nucleófilo por el grupo α -amino no protonado. A este pH, el ion hidroxilo funciona como un grupo saliente. Estas suposiciones se ven corroboradas por los datos de dependencia del pH obtenidos para la conversión catalizada por QC de Glu- β NA. En contraposición a la conversión de la glutamina de Gln- β NA mediante QC, el pH óptimo de la catálisis se desplaza al intervalo ácido de aproximadamente pH 6,0, es decir, el intervalo de pH en el que las especies de moléculas de sustrato son simultáneamente abundantes portando un grupo α -amino no

protonado y un grupo γ -carboxilo protonado. Además, el valor de pKa determinado de manera cinética de 7,55 $\pm$ 0,02 concuerda excelentemente con el del grupo α -amino de Glu- β 3NA, determinado mediante valoración (7,57 $\pm$ 0,05).

Fisiológicamente, a pH 6,0 la constante de velocidad de segundo orden (o constante específica, k_{cat}/K_M) de la ciclación de glutamato catalizada por QC podría estar en el intervalo de $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ veces inferior a la de la ciclación de glutamina. Sin embargo, el recambio no enzimático de ambos sustratos del modelo, Glu- β NA y Gln β NA, es insignificante, estando conforme con la formación de pGlu-péptido insignificante observada. Por tanto, para la formación de pGlu mediante QC, puede estimarse una aceleración de al menos 10^8 a partir de la razón de las constantes de velocidad enzimática frente a no enzimática (comparando las constantes de velocidad de segundo orden para la catálisis enzimática con las constantes de velocidad de primer orden para la ciclación no enzimática respectiva, el factor de competencia catalítica es de 10^9 - 10^{10} M⁻¹ para la conversión de Gln y de Glu, respectivamente). La conclusión de estos datos es que, *in vivo*, sólo parece concebible una ruta enzimática que da como resultado formaciones de pGlu.

Puesto que QC es sumamente abundante en el cerebro y teniendo en cuenta la velocidad de recambio de 0,9 min⁻¹ recientemente encontrada para la maduración de 30 μ M de péptido similar a (Gln-)TRH (Prokal, L., Prokai-Tatrai, K., Ouyang, X., Kim, H. S., Wu, W. M., Zharikova, A., y Bodor, N. (1999) J Med Chem 42, 4563-4571), puede pronosticarse una semivida de ciclación de aproximadamente 100 horas para un sustrato de glutamato apropiado, si se proporcionan condiciones de reacción similares. Además, dada la compartimentalización y localización de QC/EC cerebral en la ruta secretora, las condiciones de reacción y concentraciones de sustrato y enzima *in vivo* reales podrían ser incluso más favorables para la ciclación enzimática en la célula intacta. Además, si la Glu N-terminal se transforma en Gln, podría esperarse una formación de pGlu mucho más rápida mediada por QC. *In vitro*, ambas reacciones se suprimieron aplicando inhibidores de la actividad de QC/EC.

En resumen, se encontró que QC humana, que es sumamente abundante en el cerebro, es probablemente un catalizador de la formación de los péptidos de pGlu-A β amiloidogénicos a partir de precursores de Glu-A β y Gln-A β , que constituyen más del 50% de los depósitos de placas encontrados en la enfermedad de Alzheimer. Estos hallazgos identifican QC/EC como un factor en la formación de placas seniles y por tanto como una diana farmacológica novedosa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración en síndrome de Down, demencia danesa familiar y demencia británica familiar.

La neurotensina (NT) es un neuropéptido implicado en la fisiopatología de la esquizofrenia que modula específicamente sistemas de neurotransmisores que se demostró previamente que estaban regulados erróneamente en este trastorno. Estudios clínicos en los que se han medido las concentraciones de NT en líquido cefalorraquídeo (LCR) revelaron un subconjunto de pacientes esquizofrénicos con concentraciones de NT en LCR disminuidas que se restauran mediante tratamiento con fármacos antipsicóticos eficaces. Existen también pruebas considerables que concuerdan con la implicación de sistemas de NT en el mecanismo de acción de fármacos antipsicóticos. Los efectos bioquímicos y de comportamiento de NT administrada de manera central se parecen notablemente a los de fármacos antipsicóticos administrados de manera sistémica, y los fármacos antipsicóticos aumentan la neurotransmisión de NT. Esta concatenación de hallazgos condujo a la hipótesis de que NT funciona como antipsicótico endógeno. Además, fármacos antipsicóticos típicos y atípicos alteran diferentemente la neurotransmisión de NT en regiones terminales de dopamina mesolímbica y nigroestriatal, y estos efectos son predictivos de efectos secundarios de responsabilidad y eficacia, respectivamente (Binder, E. B. *et al.* 2001 Biol Psychiatry 50 856-872).

Efectores de QC o bien mantienen o bien aumentan la concentración de [pGlu¹]neurotensina activa.

El péptido promotor de la fecundación (FPP), un tripéptido relacionado con la hormona liberadora de tiotropina (TRH), se encuentra en el plasma seminal. Pruebas recientes obtenidas *in vitro* e *in vivo* mostraron que FPP desempeña un importante papel en la regulación de la fertilidad del esperma. Específicamente, FPP estimula inicialmente que espermatozoides no fertilizantes (incapacitados) "se activen" y se conviertan en fértiles más rápidamente, pero entonces detiene la capacitación de modo que los espermatozoides no experimentan pérdida del acrosoma espontánea y por tanto no pierden el potencial fertilizante. Estas respuestas las imita, y de hecho las aumenta, la adenosina, que se sabe que regula la ruta de transducción de señales de adenilil ciclasa (AC)/cAMP. Se ha mostrado que tanto FPP como adenosina estimulan la producción de AMPc en células incapacitadas pero la inhiben en células capacitadas, con receptores de FPP que interaccionan de algún modo con receptores de adenosina y proteínas G para lograr la regulación de AC. Estos acontecimientos afectan al estado de fosforilación de tirosina de diversas proteínas, siendo algunas importantes en la "activación inicial", y otras estando posiblemente implicadas en la propia reacción del acrosoma. La calcitonina y la angiotensina II, también encontradas en plasma seminal, tienen efectos similares *in vitro* sobre espermatozoides incapacitados y pueden aumentar las respuestas a FPP. Estas moléculas tienen efectos similares *in vivo*, afectando a la fertilidad estimulando y luego manteniendo el potencial de fertilización. Cualquier reducción en la disponibilidad de FPP, adenosina, calcitonina y angiotensina II o defectos en sus receptores contribuye a la esterilidad masculina (Fraser, L.R. y Adeoya-Osiguwa, S. A. 2001 Vitam Horm 63, 1-28).

Los efectores que disminuyen la actividad de QC disminuyen la concentración de [pGlu¹]FPP activo, conduciendo a

una prevención de la capacitación el esperma y la desactivación de células espermáticas. En cambio, pudo mostrarse que los efectores que aumentan la actividad de QC pueden estimular la fertilidad masculina y tratar la esterilidad.

5 Las expansiones de poliglutamina en varias proteínas conducen a trastornos neurodegenerativos, tales como corea de Huntington, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Kennedy. Por tanto, el mecanismo sigue siendo en gran medida desconocido. Las propiedades bioquímicas de las repeticiones de poliglutamina sugieren una posible explicación: la escisión endolítica en un enlace glutaminil-glutaminil seguida por formación de piroglutamato puede contribuir a la patogénesis aumentando la estabilidad catabólica, hidrofobicidad, amiloidogenicidad y neurotoxicidad de las proteínas de poliglutaminilo (Saido, T.C.; Med Hypotheses (2000) Mar; 54(3):427-9).

10 En otra realización, la presente invención proporciona un modo general para reducir o inhibir la actividad enzimática de QC usando el agente de prueba seleccionado anteriormente.

Sólo se detectó inicialmente inhibición de una QC de mamífero para 1,10-fenantrolina y 6-metilpterina reducida (Busby, W. H. J. *et al.* 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536). EDTA no inhibió QC, por tanto se concluyó que QC no es una enzima dependiente de metales (Busby, W. H. J. *et al.* 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536, Bateman, R.C.J. *et al.* 15 2001 Biochemistry 40, 11246-11250, Booth, R.E. *et al.* 2004 BMC Biology 2). Sin embargo, se mostró que QC humana y otras QC animales son enzimas dependientes de metales, tal como se revela mediante las características de inhibición de QC por 1,10-fenantrolina, ácido dipicolínico, 8-hidroxi-quinolina y otros quelantes y por la reactivación de QC mediante iones de metales de transición. Finalmente, la dependencia de metales se explica resumiendo mediante una comparación de secuencias con otras enzimas dependientes de metales, que muestra una conservación de los residuos de aminoácidos quelantes también en QC humana. La interacción de compuestos con el ion de metal unido al sitio activo representa un modo general para reducir o inhibir la actividad de QC.

20 Se prefieren para el uso en los métodos de selección descritos anteriormente QC de mamífero, en particular QC humana o murina, o QC de Papaya. Se prefiere especialmente QC de mamífero, puesto que los efectores identificados mediante estos métodos de selección se usarán para el tratamiento de enfermedades en mamíferos, especialmente en seres humanos.

25 También se proporcionan animales transgénicos no humanos en los que el transgén codifica para una isoenzima de glutaminil ciclasa.

30 Estas isoenzimas que tienen similitud de secuencia significativa con glutaminil ciclasa son proteínas (Qpctl) de ser humano (denominada adicionalmente isoQC humana) (n.º de registro de GenBank NM 017659), ratón (n.º de registro de GenBank NM 027455), *Macaca fascicularis* (n.º de registro de GenBank AB168255), *Macaca mulatta* (n.º de registro de GenBank XM 001110995), gato (n.º de registro de GenBank XM541552), rata (n.º de registro de GenBank XM001066591), vaca (n.º de registro de GenBank BT026254).

Las secuencias se facilitan en SEQ. ID NOS: 15 a 25. Se dan a conocer adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican para estas proteínas (SEQ. ID NOS: 26 a 36).

35 Se prefieren según la presente invención Qpctl seleccionadas del grupo que consiste en Qpctl humana incluyendo isoformas y formas de corte y empalme de la misma, facilitadas en SEQ. ID NOS: 15 a 17, 24 y 25; rata (SEQ. ID NO: 21) y ratón (SEQ. ID NO: 22).

Se prefieren más según la presente invención Qpctl seleccionadas del grupo que consiste en Qpctl humana incluyendo isoformas, facilitadas en SEQ. ID NOS: 15 a 17; y ratón (SEQ. ID NO: 22).

40 Las más preferidas según la presente invención son Qpctl seleccionadas del grupo que consiste en ser humano (SEQ. ID NO: 15), y ratón (SEQ. ID NO: 22).

En este sentido, se hace referencia específica al documento US 60/846.244 para una descripción adicional específica de las isoenzimas de glutaminil ciclasa.

45 Los agentes seleccionados mediante los métodos de selección descritos anteriormente pueden funcionar disminuyendo la conversión de al menos un sustrato de QC (efectores negativos, inhibidores), o aumentando la conversión de al menos un sustrato de QC (efectores positivos, activadores).

Los efectores de la actividad de QC administrados según la invención pueden emplearse en formulaciones o complejos de formulación administrables farmacéuticamente como inhibidores o en combinación con inhibidores, sustratos, pseudosustratos, inhibidores de la expresión de QC, proteínas de unión o anticuerpos de esas proteínas 50 enzimáticas que reducen la concentración de proteína QC en mamíferos. Administrando efectores de la actividad de QC a un mamífero, podría ser posible prevenir o aliviar o tratar estados seleccionados de deterioro cognitivo leve, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, demencia danesa familiar, demencia británica familiar, enfermedad de Huntington, enfermedad de úlcera y cáncer gástrico con o sin infecciones de *Helicobacter pylori*, estados psicóticos patógenos, esquizofrenia, esterilidad, neoplasia, respuestas inflamatorias del huésped, cáncer, psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, rechazo de injertos, 55

síndrome de inmunodeficiencia adquirida, respuestas inmunitarias humoral y mediada por células alteradas, procesos de migración y adhesión leucocitaria en el endotelio, ingesta de alimentos alterada, sueño-vigilia, regulación homeostática alterada del metabolismo energético, función autónoma alterada, equilibrio hormonal alterado y regulación alterada de fluidos corporales.

5 Además, administrando efectores de la actividad de QC a un mamífero podría ser posible estimular la proliferación de células del tubo digestivo, preferiblemente la proliferación de células de la mucosa gástrica, células epiteliales, la secreción aguda de ácido y la diferenciación de células parietales productoras de ácido y células de tipo enterocromafina que secretan histamina.

10 Además, la administración de inhibidores de QC a mamíferos puede conducir a una pérdida de función de células espermáticas suprimiendo así la fertilidad masculina. Por tanto, la presente invención proporciona un método para la regulación y el control de la fertilidad masculina y el uso de efectores que disminuyen la actividad de QC para la preparación de medicamentos anticonceptivos para hombres.

Además, administrando efectores de la actividad de QC a un mamífero, puede ser posible suprimir la proliferación de células progenitoras mieloides.

15 La descripción anterior describe la presente invención en general. Puede obtenerse una comprensión más completa en referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se describen únicamente para fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención. Aunque se han empleado términos específicos en el presente documento, tales términos se utilizan en un sentido descriptivo y no para fines de limitación.

Ejemplo de referencia 1: Preparación de QC humana y de papaya

20 Cepas huésped y medios

Se hizo crecer *Pichia pastoris* cepa X33 (AOX1, AOX2), usada para la expresión de QC humana, se transformó y se analizó según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se prepararon los medios requeridos para *P. pastoris*, es decir medio complejo de glicerol tamponado (BMGY) o complejo de metanol (BMMY), y el medio de sales basales de fermentación según las recomendaciones del fabricante.

25 Clonación molecular de vectores de plásmidos que codifican para la QC humana

Todos los procedimientos de clonación se realizaron aplicando técnicas de biología molecular convencionales. Para la expresión en levadura, se usó el vector pPICZ α B (Invitrogen). Se usó el vector pQE-31 (Qiagen) para expresar la QC humana en *E. coli*. Se fusionó en marco el ADNc de la QC madura empezando con el codón 38 con la etiqueta de 6x histidina codificada por plásmido. Tras la amplificación usando los cebadores pQCyc-1 y pQCyc-2 (documento WO 2004/098625) y la subclonación, se insertó el fragmento en el vector de expresión empleando los sitios de restricción de SphI y HindIII.

Transformación de *P. pastoris* y expresión a miniescala

35 Se amplificó ADN de plásmido en *E. coli* JM109 y se purificó según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). En el plásmido de expresión usado, pPICZ α B, se proporcionan tres sitios de restricción para la linealización. Dado que SacI y BstXI cortan dentro del ADNc de QC, se eligió PmeI para la linealización. Se linealizaron 20-30 μ g de ADN de plásmido con PmeI, se precipitaron mediante etanol, y se disolvieron en agua desionizada estéril. Entonces se aplicaron 10 μ g del ADN para la transformación de células de *P. pastoris* competentes mediante electroporación según las instrucciones del fabricante (BioRad). Se realizó la selección en placas que contenían 150 μ g/ml de zeocina. Una transformación usando el plásmido linealizado produjo varios cientos de transformantes.

40 Con el fin de someter a prueba los clones de levadura recombinantes para determinar la expresión de QC, se hicieron crecer recombinantes durante 24 h en tubos cónicos de 10 ml que contenían 2 ml de BMGY. Después de eso, se centrifugó la levadura y se resuspendió en 2 ml de BMMY que contenía el 0,5% de metanol. Se mantuvo esta concentración mediante adición de metanol cada 24 h hasta 72 h. Posteriormente, se determinó la actividad de QC en el sobrenadante. Se confirmó la presencia de la proteína de fusión mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo dirigido contra la etiqueta de 6 x histidina (Qiagen). Se eligieron clones que mostraban la mayor actividad de QC para experimentos adicionales y fermentación.

Expresión a gran escala en un fermentador

50 Se realizó la expresión de la QC en un reactor de 5 l (Biostat B, B. Braun biotech), esencialmente tal como se describe en "Pichia fermentation process guidelines" (Invitrogen). En resumen, se hicieron crecer las células en el medio de sales basales de fermentación complementado con sales traza, y con glicerol como única fuente de carbono (pH 5,5). Durante una fase discontinua inicial durante aproximadamente 24 h y una fase discontinua alimentada posterior durante aproximadamente 5 h, se acumuló masa celular. Una vez que se alcanzó un peso en húmedo de células de 200 g/l, se realizó la inducción de la expresión de QC usando metanol aplicando un perfil de alimentación de tres etapas durante un tiempo de fermentación completo de aproximadamente 60 h. Posteriormente,

se retiraron células del sobrenadante que contenía QC mediante centrifugación a 6000xg, 4°C durante 15 min. Se ajustó el pH a 6,8 mediante adición de NaOH, y se centrifugó de nuevo la disolución turbia resultante a 37000xg, 4°C durante 40 min. En casos de que continuara la turbidez, se aplicó una etapa de filtración adicional usando una membrana de celulosa (ancho de poro de 0,45 µm).

5 Purificación de QC con etiqueta de 6 x histidina expresada en *P. pastoris*

En primer lugar se purificó esta QC con etiqueta de His mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). En una purificación típica, se aplicaron 1000 ml de sobrenadante de cultivo a una columna Chelating Sepharose FF cargada con Ni²⁺ (1,6 x 20 cm, Pharmacia), que se equilibró con tampón fosfato 50 mM, pH 6,8, que contenía NaCl 750 mM, a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Tras lavar con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado que contenía histidina 5 mM, se eluyó la proteína unida mediante un cambio a tampón fosfato 50 mM, pH 6,8, que contenía NaCl 150 mM e histidina 100 mM. Se dializó el eluato resultante frente a Bis-Tris/HCl 20 mM, pH 6,8, a 4°C durante la noche. Posteriormente, se purificó adicionalmente la QC mediante cromatografía de intercambio aniónico con una columna Mono Q6 (BioRad), equilibrada con tampón de diálisis. Se cargó la fracción que contenía QC sobre la columna usando una velocidad de flujo de 4 ml/min. Entonces se lavó la columna con tampón de equilibrado que contenía NaCl 100 mM. Se realizó la elución mediante dos gradientes que dieron como resultado tampón de equilibrado que contenía NaCl 240 mM y 360 mM en 30 ó 5 volúmenes de columna, respectivamente. Se recogieron fracciones de 6 ml y se analizó la pureza mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían QC homogénea se combinaron y concentraron mediante ultrafiltración.

20 Para el almacenamiento a largo plazo (-20°C), se añadió glicerol hasta una concentración final del 50%. Se cuantificó la proteína según los métodos de Bradford o Gill y von Hippel (Bradford, M. M. 1976 Anal Biochem 72, 248-254; Gill, S.C. y von Hippel, P.H. 1989 Anal Biochem 182, 319-326.).

Expresión y purificación de QC en *E. coli*

25 Se transformó el constructo que codificaba para la QC en células M15 (Qiagen) y se hicieron crecer en placas de agar LB selectivo a 37°C. Se llevó a cabo la expresión de proteína en medio LB que contenía el 1% de glucosa y el 1% de etanol a temperatura ambiente. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8, se indujo la expresión con IPTG 0,1 mM durante la noche. Tras un ciclo de congelación y descongelación, se lisaron las células a 4°C mediante adición de 2,5 mg/ml de lisozima en tampón fosfato 50 mM, pH 8,0, que contenía NaCl 300 mM e histidina 2 mM durante aproximadamente 30 min. Se aclaró la disolución mediante centrifugación a 37000 xg, 4°C durante 30 min, seguido por una filtración aplicando una frita de vidrio (separación de ADN) y dos etapas de filtración adicionales aplicando filtros de celulosa para precipitados finos y brutos. Se aplicó el sobrenadante (aproximadamente 500 ml) sobre una columna de afinidad de Ni²⁺ (1,6 x 20 cm) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se llevó a cabo la elución de QC con tampón fosfato 50 mM que contenía NaCl 150 mM e histidina 100 mM. Se concentró la fracción que contenía QC mediante ultrafiltración.

35 Purificación de QC a partir de látex de papaya

Se preparó QC a partir de látex de papaya usando el instrumento BioCAD 700E (Perseptive Biosystems, Wiesbaden, Alemania) con una versión modificada de un método previamente notificado (Zerhouni, S. *et al.* 1989 Biochim Biophys Acta 138, 275-290). Se disolvieron 50 g de látex en agua y se centrifugaron tal como se describe en ese documento. Se realizó la inactivación de proteasas con S-metil-metan-tiosulfonato, y se dializó el extracto bruto resultante. Tras la diálisis, se cargó el sobrenadante completo sobre una columna SP Sepharose Fast Flow (21 X 2,5 cm de d.i.), equilibrada con tampón acetato de sodio 100 mM, pH 5,0 (velocidad de flujo de 3 ml/min). Se realizó la elución en tres etapas aumentando la concentración de tampón acetato de sodio a una velocidad de flujo de 2 ml/min. La primera etapa fue un gradiente lineal de tampón acetato desde 0,1 hasta 0,5 M en 0,5 volúmenes de columna. La segunda etapa fue un aumento lineal de la concentración de tampón desde 0,5 hasta 0,68 M en cuatro volúmenes de columna. Durante la última etapa de elución, se aplicó un volumen de columna de tampón 0,85 M. Se combinaron fracciones (6 ml) que contenían la mayor actividad enzimática. Se realizaron cambios de concentración y tampón a Tris/HCl 0,02 M, pH 8,0 mediante ultrafiltración (Amicon; punto de corte de masa molecular de la membrana de 10 kDa).

50 Se añadió sulfato de amonio a la enzima de papaya concentrada, obtenida a partir de la etapa de cromatografía de intercambio iónico hasta una concentración final de 2 M. Se aplicó esta disolución sobre una columna Butyl Sepharose 4 Fast Flow (21 X 2,5 cm d.i.) (velocidad de flujo de 1,3 ml/min), equilibrada con sulfato de amonio 2 M, Tris/HCl 0,02 M, pH 8,0. Se realizó la elución en tres etapas con concentraciones decrecientes de sulfato de amonio. Durante la primera etapa se aplicó un gradiente lineal de sulfato de amonio desde 2 hasta 0,6 M, Tris/HCl 0,02 M, pH 8,0 durante 0,5 volúmenes de columna a una velocidad de flujo de 1,3 ml/min. La segunda etapa fue un gradiente lineal de sulfato de amonio desde 0,6 hasta 0 M, Tris/HCl 0,02 M, pH 8,0, en 5 volúmenes de columna a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. La última etapa de elución se llevó a cabo aplicando Tris/HCl 0,02 M a pH 8,0 durante 2 volúmenes de columna a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. Se combinaron todas las fracciones que contenían actividad de QC y se concentraron mediante ultrafiltración. Se almacenó la QC homogénea resultante a 70°C. Se determinaron las concentraciones de proteína finales usando el método de Bradford, en comparación con

una curva patrón obtenida con albúmina de suero bovino.

La secuencia de ADNc de glutaminil ciclasa humana se muestra en SEQ ID No: 12, mientras que la secuencia de proteína se muestra en SEQ ID No: 13.

Ejemplo de referencia 2: Ensayos de actividad glutaminil ciclasa

5 Ensayos fluorométricos

Se realizaron mediciones con un lector BioAssay HTS-7000Plus (Perkin Elmer) o un lector NovoStar (BMG Labtechnologies) para microplacas a 30°C. Se evaluó la actividad de QC de manera fluorométrica usando H-Gln-βNA. Las muestras consistían en sustrato fluorogénico 0,2 mM, 0,25 U de piroglutamyl aminopeptidasa (Unizyme, Horsholm, Dinamarca) en Tris/HCl 0,2 M, pH 8,0 que contenía EDTA 20 mM y una alícuota apropiadamente diluida de QC en un volumen final de 250 μl. Las longitudes de onda de excitación/emisión fueron de 320/410 nm. Las reacciones de ensayo se iniciaron mediante adición de glutaminil ciclasa. Se determinó la actividad de QC a partir de una curva patrón de β-naftilamina en condiciones de ensayo. Se define una unidad como la cantidad de QC que cataliza la formación de 1 μmol de pGlu-βNA a partir de H-Gln-βNA por minuto en las condiciones descritas.

En un segundo ensayo fluorométrico, se determinó la actividad de QC usando H-Gln-AMC como sustrato. Se llevaron a cabo reacciones a 30°C usando el lector NOVOSTAR para microplacas (BMG labtechnologies). Las muestras consistieron en diversas concentraciones del sustrato fluorogénico, 0,1 U de piroglutamyl aminopeptidasa (Qiagen) en Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM y una alícuota apropiadamente diluida de QC en un volumen final de 250 μl. Las longitudes de onda de excitación/emisión fueron de 380/460 nm. Se iniciaron las reacciones de ensayo mediante adición de glutaminil ciclasa. Se determinó la actividad de QC a partir de una curva patrón de 7-amino-4-metilcumarina en condiciones de ensayo. Se evaluaron los datos cinéticos usando software GraFit.

Ensayo espectrofotométrico de QC

Se usó este ensayo novedoso para determinar los parámetros cinéticos para la mayoría de los sustratos de QC. Se analizó la actividad de QC de manera espectrofotométrica usando un método continuo, que se derivó adaptando un ensayo discontinuo anterior (Bateman, R. C. J. 1989 J Neurosci Methods 30, 23-28) usando glutamato deshidrogenasa como enzima auxiliar. Las muestras consistieron en el sustrato de QC respectivo, NADH 0,3 mM, ácido α-cetoglutarico 14 mM y 30 U/ml de glutamato deshidrogenasa en un volumen final de 250 μl. Se iniciaron las reacciones mediante adición de QC y se continuaron mediante monitorización de la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 8-15 min.

Se evaluaron las velocidades iniciales y se determinó la actividad enzimática a partir de una curva patrón de amoníaco en condiciones de ensayo. Se midieron todas las muestras a 30°C, usando el lector o bien SPECTRAFluor Plus o bien Sunrise (ambos de TECAN) para microplacas. Se evaluaron los datos cinéticos usando software GraFit.

Ensayo inhibidor

Para las pruebas de inhibidor, la composición de muestra fue la misma que la descrita anteriormente, excepto por el supuesto compuesto inhibidor añadido. Para una prueba rápida de inhibición de QC, las muestras contenían 4 mM del inhibidor respectivo y una concentración de sustrato a 1 K_M. Para investigaciones detalladas de la inhibición y determinación de los valores de K_i, se investigó en primer lugar la influencia del inhibidor sobre las enzimas auxiliares. En todos los casos, no se detectó influencia sobre ninguna enzima, permitiendo por tanto la determinación fiable de la inhibición de QC. Se evaluó la constante inhibitoria ajustando el conjunto de curvas de progreso a la ecuación general para la inhibición competitiva usando software GraFit.

Ejemplo de referencia 3: Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se llevó a cabo una espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz usando el sistema Hewlett-Packard G2025 LD-TOF con un analizador de tiempo de vuelo lineal. El instrumento estaba equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm, una fuente de aceleración de potencial (5 kV) y un tubo de vuelo de 1,0 m. El funcionamiento del detector estaba en el modo de iones positivos y se registraron señales y se filtraron usando un osciloscopio de almacenamiento digital LeCroy 9350M conectado a un ordenador personal. Se mezclaron muestras (5 μl) con volúmenes iguales de disolución de matriz. Para la disolución de matriz se usó DHAP/DAHC, preparada disolviendo 30 mg de 2',6'-dihidroxiacetofenona (Aldrich) y 44 mg de hidrogenocitrato de diamonio (Fluka) en 1 ml de acetonitrilo/0,1% de TFA en agua (1/1, v/v). Se transfirió un pequeño volumen (≈1 μl) de la mezcla matriz-análito a una punta de sonda y se evaporó inmediatamente en una cámara de vacío (accesorio de preparación de muestras Hewlett-Packard G2024A) para garantizar una cristalización de muestras rápida y homogénea.

Para las pruebas a largo plazo de la ciclación de Glu¹, se incubaron péptidos derivados de Aβ en 100 μl de tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5,2 o tampón Bis-Tris 0,1 M, pH 6,5 a 30°C. Se aplicaron péptidos en concentraciones de 0,5 mM [Aβ3-11 a] o 0,15 mM [Aβ3-21a], y se añadieron 0,2 U de QC cada 24 horas. En el caso de Aβ3-21a, los

ensayos contenían el 1% de DMSO. En diferentes momentos, se extrajeron muestras del tubo de ensayo, se extrajeron péptidos usando pipetas ZipTip (Millipore) según las recomendaciones del fabricante, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas. Los controles negativos o bien no contenían QC o bien contenían enzima desactivada por calor. Para los estudios de inhibidor, la composición de la muestra fue la misma que la descrita anteriormente, con la excepción del compuesto inhibidor añadido (bencimidazol 5 mM o 1,10-fenantrolina 2 mM).

Ejemplo de referencia 4: Qpct murina

Se aisló Qpct murina a partir de la línea celular de insulinooma murina β -TC 3 mediante RT-PCR usando cebadores derivados de un supuesto ADNc de QC murina, que se depositó en la base de datos de nucleótidos como la entrada AK017598 y se subclonó en el vector pPCR Script CAM SK(+) (Schilling S. *et al.*; Biochemistry 44(40) 13415-13424). Qpct murina tal como se usa en los siguientes ejemplos está comprendida en un constructo, es decir un casete génico (SEQ ID No:9); la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID No:10.

Clonación de QC murina

Los cebadores para el aislamiento del marco de lectura abierto de mQC se diseñaron usando la entrada de nucleótidos AK017598 en PubMed, que codifica para la supuesta mQC. Las secuencias de cebadores fueron las siguientes: sentido 5' ATATGCATGCATGGCAGGCAGCGAAGACAAGC (SEQ ID NO: 11); antisentido 5' ATATAAGCTTTTACAAGTGAAGATATTCCAACACAAAGAC (SEQ ID NO: 12). Se aisló ARN total a partir de células β -TC 3 de la línea celular de insulinooma murina usando el kit RNeasy Mini (Qiagen) y se sometió a transcripción inversa mediante SuperScriptII (Invitrogen). Posteriormente, se amplificó ADNc de mQC en una dilución 1:12,5 de producto generado en una reacción de 50 μ l con ADN polimerasa Herculase Enhanced (Stratagene), se insertó en el vector de clonación PCR Script CAM (Stratagene) y se verificó mediante secuenciación. Se amplificó el fragmento de ADNc que codificaba para la mQC madura usando los cebadores 5' ATACTCGAGAAAAGAGCCTGGACGCAGGAGAAG (SEQ ID NO: 13) (XhoI, sentido) y 5' ATATCTAGATTACAAGTGAAGATATTCCAAC (SEQ ID NO: 14) (XbaI, antisentido). Se ligó el fragmento digerido en el vector pPICZ α B, se propagó en *E. coli* y se verificó secuenciando la cadena sentido y antisentido. Finalmente, se linealizó el plásmido de expresión usando PmeI, se precipitó y se almacenó a -20°C.

Transformación de *P. pastoris* y expresión a miniescala de QC murina

Se aplicaron 1-2 μ g de ADN de plásmido para la transformación de células de *P. pastoris* competentes mediante electroporación según las instrucciones del fabricante (BioRad). Se realizó una selección en placas que contenían 100 μ g/ml de zeocina. Con el fin de someter a prueba los clones de levadura recombinantes tras la expresión de mQC, se hicieron crecer recombinantes durante 24 h en tubos cónicos de 10 ml que contenían 2 ml de BMGY. Posteriormente, se centrifugó la levadura y se resuspendió en 2 ml de BMMY que contenía el 0,5% de metanol. Se mantuvo esta concentración mediante adición de metanol cada 24 h durante aproximadamente 72 h. Posteriormente, se determinó la actividad de QC en el sobrenadante. Se eligieron clones que mostraban la mayor actividad para experimentos adicionales y fermentación.

Expresión a gran escala y purificación de QC murina

Se realizó la expresión de mQC en un reactor de 5 l (Biostad B, B. Braun biotech, Melsungen, Alemania). Se llevó a cabo la fermentación en medio de sales basales complementado con sales traza a pH 5,5. Inicialmente, se acumuló biomasa en un lote y una fase de lote de alimentación con glicerol como la única fuente de carbono durante aproximadamente 28 h. Se inició la expresión de mQC mediante alimentación de metanol según un perfil de tres etapas recomendado por Invitrogen durante un tiempo de fermentación completo de aproximadamente 65 h. Posteriormente, se retiraron las células y la turbidez del sobrenadante que contenía mQC mediante dos etapas de centrifugación secuenciales a 6000 x g y 38000 x g durante 15 min y 4 h, respectivamente. Para la purificación, se diluyó el caldo de fermentación con agua hasta una conductividad de aproximadamente 5 mS/cm y se aplicó en una dirección de flujo inversa (15 ml/min) sobre una columna Streamline SP XL (2,5 x 100 cm), equilibrada con tampón fosfato 0,05 M, pH 6,4. Tras una etapa de lavado en dirección de flujo inversa con tampón de equilibrado durante 2 volúmenes de columna, se eluyeron proteínas a una velocidad de flujo de 8 ml/min usando tampón Tris 0,15 M, pH 7,6, que contenía NaCl 1,5 M en dirección directa. Se combinaron las fracciones que contenían QC y se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de 1 M. Se aplicó la disolución resultante sobre una columna Butyl Sepharose FF (1,6 x 13 cm) a una velocidad de flujo de 4 ml/min. Se lavó la mQC unida con tampón fosfato 0,05 M, pH 6,8 que contenía sulfato de amonio 0,75 M durante 5 volúmenes de columna y se eluyó en dirección de flujo inversa con tampón fosfato 0,05 M, pH 6,8. Se combinaron las fracciones que contenían mQC y se desalaron durante la noche mediante diálisis frente a Tris 0,025 M, pH 7,5. Después de eso, se ajustó el pH a 8,0 mediante adición de NaOH y se aplicó (4,0 ml/min) sobre una columna Uno Q (Bio Rad), equilibrada con Tris 0,02 M, pH 8,1. Tras una etapa de lavado usando tampón de equilibrado, se eluyó mQC usando el mismo tampón que contenía NaCl 0,18 M. Se combinaron fracciones que mostraban actividad de QC y se ajustó el pH a 7,4 mediante adición de tampón Bis-Tris 1 M, pH 6,0. mQC era estable a 4°C durante hasta 1 mes. Para el almacenamiento a largo plazo a -20°C, se añadió glicerol al 50%.

MEJOR REALIZACIÓN PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo 1: Clonación del vector transgénico pTG-CAG-mQC

El vector de ADNc de mQC en pPCR Script Cam (mQC K10) es una alícuota de ADN de plásmido circular. Contiene el marco de lectura abierto (ORF) de Qpct murina tal como se mostró anteriormente usando cebadores que

Se verificó el plásmido entregado mediante análisis de restricción usando NcoI, NotI y NsiI. Se obtuvo el perfil de digestión esperado y no se observó ningún signo de degradación.

Debido al sitio de restricción SphI adicional dentro del cebador 5' que se usó para el aislamiento de ORF, la secuencia de ácido nucleico ATG se había insertado 4 pares de bases en el sentido de 3' del codón de iniciación de Qpct (véase la figura 1B). Si se clona este casete de ADNc en el sentido de 3' de un promotor este ATG adicional conducirá a un desplazamiento del marco en la traducción. Por tanto el ATG del sitio de reconocimiento SphI tenía que retirarse antes de que pudiera producirse el ensamblaje del promotor y ADNc en el vector transgénico.

Con este fin, se aisló el casete de ADNc de Qpct mediante los sitios de restricción NsiI (5') y NotI (3') y se insertó dentro del vector de clonación pBlue Script SK+ (Stratagene), que se linealizó usando la enzima de restricción PstI y NotI (véase la figura 2). El nuevo ligamiento de las proyecciones de NsiI/PstI condujo a la delección del ATG intermedio dejando el resto del ATG de iniciación del Qpct-ORF intacto. Después de eso se aisló el casete de ADNc modificado mediante HindIII y NotI a partir de la estructura principal de pBlue Script SK+ y se insertó en un vector de expresión que ya contenía las secuencias de promotor de CAG y señal de poliA de BGH dentro de la estructura principal del vector pcDNA3.1 (Invitrogen) (véase la figura 2).

El plásmido resultante contiene el ORF del gen de glutaminil-péptido ciclotransferasa murino en el sentido de 3' del casete de promotor de CAG ubicuamente sobreexpresado y en el sentido de 5' de la señal de poliA de BGH. El vector transgénico se denominó pTG-CAG-mQC.

Se verificó el plásmido pTG-CAG-mQC mediante análisis de restricción (véase la figura 3) y secuenciación. El constructo transgénico puede retirarse de la estructura principal del plásmido usando una doble digestión de restricción ApaLI/ DraIII.

Ejemplo 2: Verificación de la secuencia

Se verificaron las regiones de unión relevantes del constructo transgénico pTG-CAG-mQC mediante secuenciación de ADN. La tabla 1 muestra las secuencias de los cebadores usados. Las secuencias obtenidas de los fragmentos de unión de clonación se muestran a continuación (SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2). Estas secuencias confirmaron la correcta inserción del casete de ADNc de Qpct.

Tabla 1: Cebadores de secuenciación

Nombre	Secuencia	SEQ. ID. NO
pcDNA3.1-F1	5'-GGT TCC GCG CAC ATT TCC CCG A-3'	3
CAG-Pr-F1	5'-GCT GGT TAT TGT GCT GTC TCA-3'	4
pcDNA3.1-R1	5'-GCT TAA TGC GCC GCT ACA-3'	5

Sec. 1: Cebador pcDNA3.1-F1

1	acggggagatc	ctctagctcg	acattgatsa	ctgactagtt	atttattagta
51	atcaatcaag	gggtcattag	ctcatagccc	atctatggag	tccgggttta
101	tataacttac	ggttatatgg	cgcctggct	gacggatcaa	cgacccccc
151	caatggagct	caataatgac	gtatgttccc	atagtaacgc	caataggggac
201	tttccattga	cgtcaatggg	tggagtattt	acggtaaaact	gcccacttgg
251	cagtaacata	agtgtatcat	atgccaaagta	cgcctccctat	tgatgtcaat
301	gacggtaaat	ggcccgcccg	gcattatgac	cagtaatctga	cattatggga
351	cttccctaac	tggcagtaaa	tctacgtatt	agtaatcgct	attaccatgg
401	tayaggggag	ccccacgccc	tgcttcaactc	tccaaatctc	ccccccctcc
451	ccaccccaaa	ttttgtactt	atttatcttc	taattatctt	gtgcagcgat
501	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg
551	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg
601	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg	gggggggggg
651	ctataaaaag	c			

Casete de prom.
de CAG

Sec. 2: Cántigo (cebador CAG-Pr-F1/pcDNA3.1-R1)

1	ccacattctctg	cgcgcgcgcac	cacagccact	ttctactcttg	cctccctcta	Prom. de CAG
51	ctgtctctctg	cctctgtctga	ggggcgcgcgc	ggggtcccta	gacccgcggt	<u>HindIII</u>
101	agaaaggcttg	atatogaatt	cctgcATGgc	agggcgcgcgc	gacccgcggt	
151	tcgtggggcgc	tctccacctg	cgtctactgc	agggcgcgcgc	cctgtctctg	Codón de iniciación
201	ccagctggga	atctyagctt	ggtctccgct	gctgggcgcgc	agggcgcgcgc	
251	ccaccaccca	ccagccactt	tgaattcttc	atctctctcg	ccagctggga	
301	agggcactag	cattctctga	atgtggcaca	ccagctggga	acccctgggt	
351	atagacagct	atcctgggac	gcccgggagc	ctctctctct	gtcagccact	
401	catgacagca	atccagagac	ctcagggctga	ctcagggctga	gaggtctgac	
451	cctctccagag	taggactccc	tatggctctc	ggtctctctc	aatatctctc	
501	agcactctta	accgggagac	gaaacgcgcac	ctggctctct	cctgcccact	
551	cgactccaaa	tatttctctc	gatgggagac	ccagctggga	gtgggagcca	
601	cggatccagc	tgtgcaagct	gcacagatgt	tggaactctg	cctgtgctta	
651	gacaaagaaa	tccattctct	gaaaggatgt	tctggttcca	agccagatct	Casete de ADNc
701	ctcactccag	ctaatctctc	ttgatgggca	agggctctct	cctcactctg	
751	ccctctcaga	ttctctgctt	gggtctctgc	ctcagctctc	gaggtctgga	
801	tcaagccctc	acctctctct	ctcagagagc	acccacccac	tgggtggcat	
851	ggatctcttg	gtctctctag	atttcaattg	agcagcactt	ccacactctc	
901	ctaatctctt	cccaagactt	cccaagctgt	ttcctctctc	tcaagctctt	
951	gaaaggggac	ctctgcaatt	gggtctctgc	agggctctct	ctctgagagc	
1001	gaggtctctt	caggtctctt	gctatgggaa	tattctctct	gatgacccac	
1051	ttcctctctt	aggaagaggt	gtccacagtc	ttcactctgc	agctctctct	
1101	ctccctctgag	tctgggcacac	catgggatgc	aatgaagaaa	atctactctg	
1151	gtcaccacac	gacattctct	acaaactctc	tcagctctct	gtgtctggaat	
1201	atctctctct	gTAAGagcgc	tctagagiat	ccctcagagc	tagggggccc	Parada
1251	gttttaaccc	gtgacacagc	ctcagctctg	cctctctctt	gcccgcactc	
1301	ttgtgtcttg	ccctcccccg	tgccctctct	gcccctggaa	gtgcccactc	
1351	ccatctgccc	ttcttaacac	aatgagggaa	tctgacacgc	ttgtctgagt	poliA de BGH
1401	aggtgtctct	ctattctctg	gggtctctct	gggtctctct	gcaaggggga	
1451	ggatctggga	gacattctct	ggcctctctg	ggatctctct	ggctctctct	
1501	ctctctgagc	ggaaagacac	agctggg			

Ejemplo 3: Establecimiento de la PCR de selección

Para establecer la selección mediante PCR para el genotipado de los ratones transgénicos generados, se diseñaron dos cebadores amplificando un producto de PCR específico de aproximadamente 1585 pb a partir del ADN de pTG-CAG-mQC (véase la figura 3). El cebador directo CAG-Pr-F1 (SEQ ID No: 2) se une específicamente en el segmento de promotor de CAG y el cebador inverso GX1675-TOR1-FF (SEQ ID No:6) se une dentro de la secuencia de poliA de BGH del casete de ADNc de Qpct. Para confirmar que la PCR de selección es suficientemente sensible al nivel de ADN genómico, se diluyó en serie el ADN de vector transgénico con ADN genómico de tipo natural. Las secuencias de cebadores y las condiciones de PCR optimizadas se indican en la tabla 2. La figura 4 muestra el resultado de la selección de sensibilidad.

Tabla 2: Condiciones de PCR de la PCR de selección

Nombre		Secuencia			
CAG-Pr-F1		5'-GCT GGT TAT TGT GCT GTC TCA-3'			
GX1675-TOR1-FF		5'-TTC TTT CCG CCT CAG AAG CCA TAG AGC-3'			

Mezcla de reacción		Reacción			
(pTG-CAG-mQC)	0,1/1/10 copias	Etapa	Temp.	Tiempo	Ciclos
ADN de ratón genómico	150 ng	Desnaturalización	94°C	120 s	1x
Cebadores	10 µM	Desnaturalización	94°C	30 s	35x
dNTP	0,35 mM	Apareamiento	60°C	30 s	
Tampón de reacción 3	2,25 mM	Extensión	72°C	120 s	
Expansión larga	2,5 U	Finalización	72°C	600 s	1x
Volumen de reacción	50,0 pl				

5 El ADN de pTG-CAG-mQC todavía podía detectarse a una dilución de 0,1 copias por mezcla de reacción, confirmando que la selección mediante PCR es suficientemente sensible para detectar un acontecimiento de integración para la selección de posibles ratones fundadores.

Tal como se muestra en la figura 3, los sitios de restricción de ApaLI/DraIII permiten aislar el ADN de constructo transgénico a partir de la estructura principal de plásmido. El plásmido pTG-CAG-mQC se digirió con esta enzima y el fragmento de 3806 pb de tamaño resultante se aislará y se purificará para su microinyección en ovocitos de ratón.

10 Se inyectó el constructo transgénico pTG-CAG-mQC, generado en los ejemplos 1 a 3 tal como se mostró anteriormente, en el pronúcleo macho de ovocitos fertilizados. Tras un cultivo durante la noche, se transplantaron los embriones bicelulares resultantes en madres de adopción pseudoembarazadas. Los ratones nacidos se caracterizaron para determinar la integración del transgén mediante análisis por PCR.

15 A continuación se describe el trabajo realizado para la fase de inyección en pronúcleo (PNI) del proyecto y detalles de la identificación de fundadores.

Ejemplo 4: Preparación del constructo

20 Se clonó el vector pTG-CAG-mQC tal como se mostró anteriormente. Se clonó el casete génico de Qpct directamente en el sentido de 3' del potenciador de CMV / promotor de beta-actina del pollo (CAG) híbrido y en el sentido de 5' de la señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina (BGH), generando el vector transgénico pTG-CAG-mQC.

25 Se digirió el plásmido pTG-CAG-mQC mediante enzimas de restricción DraIII y Sall y se separó electroforéticamente el fragmento de 3552 pb que contenía el constructo transgénico de interés de la estructura principal de vector (figura 5). Se aisló el fragmento de constructo transgénico de ~3,6 kb, se purificó y se diluyó en tampón de microinyección hasta una concentración de 5 ng/µl. Se verificaron la pureza del constructo y la concentración mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 5).

30 Se aparearon ratones C57BL/6 hembra de 3-4 semanas de edad con ratones C57BL/6 macho. Se recogieron los ovocitos fertilizados resultantes del oviducto de ratones hembra con tapón y se cultivaron hasta que podían verse dos pronúcleos claros. Se microinyectó el constructo transgénico purificado en el pronúcleo macho (figura 6) y se cultivaron los embriones inyectados durante la noche hasta la fase bicelular. Entonces se implantaron los embriones bicelulares en el oviducto de madres de adopción pseudoembarazadas a los 0,5 días tras el coito.

Tras 18-19 días, nacieron crías de las madres de adopción. La tabla 3 resume las sesiones de microinyección de ADN realizadas.

Tabla 3: Resumen de las sesiones de PNI

N.º de	Fecha	de	Embriones	N.º	de	Madres	de	Abortos	N.º	de	Crías
				madres	de	de	adopción		crías		

PNI.	inyección	transferidos	adopción	embarazadas		nacidas	viabiles
1	27.01.05	40	1	1	1 x, °	0	0
2	29.01.05	38	1	1	-	2	1
3	31.01.05	40	1	1	1 x	0	0
4	09.02.05	100	3	2	-	7	4
5	16.02.05	49	2	1	-	8	8
6	02/03.03.05	83	2	1	-	5	5
7	16./17.03	111	3	2	-	20	20
8	06.04.05	82	4	0	-	0	0
9	03/04.05	146	6	4	1 x	23	23
	en total	689	2	13	3 x	65	61

Tal como se presenta en la tabla 3, se transfirió un total de 689 embriones en madres de adopción, conduciendo al nacimiento de 61 crías viabiles.

Ejemplo 5: Selección de fundadores transgénicos

- 5 Se prepararon biopsias de la punta de la cola de las 61 crías destetadas y se extrajo ADN. Se genotiparon los ADN individuales mediante PCR de selección transgénica que se estableció en los ejemplos anteriores. El par de cebadores CAG-Pr- F1/ GX1675-TOR1-FF (representado en la figura 5A con flechas oscuras, SEQ ID Nos: 4 y 7) amplifica la unión promotor-ADNc, proporcionando un producto de PCR de 1585 pb específico cuando el constructo transgénico se ha integrado en el genoma huésped.
- 10 Una segunda PCR usando un cebador directo BGH-F1 (SEQ ID No: 7), que se une a la secuencia de poliA de BGH del constructo transgénico, y un cebador inverso CAG-Pr-R2 (SEQ ID No: 8), que se une al extremo 5' del casete de promotor, aprovecha la integración de cabeza a cola observada con frecuencia del constructo transgénico y amplifica un fragmento de aproximadamente 834 pb. Este producto de amplificación sólo se produce cuando se ha integrado en tándem más de una copia del constructo transgénico.
- 15 Las secuencias de cebadores se indican en la tabla 4 y las condiciones de PCR optimizadas de ambas PCR se indican en las tablas 5 y 6. Se confirmó la calidad del ADN usando cebadores específicos para un gen de control. La figura 7 muestra un ejemplo de los resultados de selección mediante PCR.

Tabla 4: Cebador de genotipado

Tipo de PCR	Nombre del cebador	Secuencia de cebador (5' -3')	Tamaño esperado
Transgén	CAG-Pr-F1	GCTGGTTATTGTGCTGTCTCA	1585 pb
	GX1675-TOR1 -FF	TTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGC	
Cabeza a cola	BGH-F1	TGTAGGTGGCAGAGAGACTA	834 pb
	CAG-Pr-R2	CTGCCAAGTAGGAAAGTCCCAT	

20 Tabla 5: Protocolo de PCR de selección de transgén

Mezcla de reacción		Reacción			
ADN genómico	-150,0 ng	Etapas	Temp.	Tiempo	Ciclos
Par de cebadores	10,0 pmol	Desnaturalización	94°C	420 s	1x
dNTP	0,35 mM	Desnaturalización	94°C	30 s	35x
Tampón de reacción 3	0,1 Vol	Apareamiento	62°C	30 s	

Expansión larga (Roche)	2,5 U	Extensión	68°C	120 s	1x
Volumen de reacción	50,0 µl	Finalización	68°C	600 s	

Tabla 6: Protocolo de PCR de selección de cabeza a cola

Mezcla de reacción		Reacción			
ADN genómico	-100,0 ng	Etapas	Temp.	Tiempo	Ciclos
Par de cebadores	10,0 pmol	Desnaturalización	94°C	420 s	1x
dNTP	0,2 mM	Desnaturalización	94°C	45 s	35x
Tampón de reacción/MgCl ₂ 15 mM	0,1 Vol	Apareamiento	55°C	45 s	
Disolución Q (Quiagen)	0,2 Vol	Extensión	72°C	45 s	
Taq polimerasa	1,5 U	Finalización	72°C	300 s	1x
Volumen de reacción	25,0 µl				

- 5 La selección mediante PCR de las 61 crías con ambos tipos de PCR de genotipado dio como resultado la identificación de un animal transgénico positivo. Tal como puede observarse en la figura 7, pudo identificarse el fundador n.º 37460 (indicado en la tabla 7) usando la PCR de transgén. También demuestra ser positivo para la PCR de cabeza a cola, lo que sugiere que se ha producido una integración en tándem del constructo transgénico.

El resultado de la microinyección de ADN revela que sólo el 1,6% de los animales genotipados habían integrado el ADN de transgén.

- 10 Tabla 7: Fundador identificado positivo para la línea transgénica CAG-mQC

N.º de ratón	Generación	Fecha de nacimiento	Sexo	Genotipo
37460	F0	25.05.05	hembra	TG/+

Los ejemplos 4 y 5 resumen el trabajo realizado para la generación del modelo de ratón transgénico CAG-mQC usando el enfoque de microinyección pronuclear (PNI).

- 15 Se preparó el constructo transgénico pTG-CAG-mQC, se purificó y se inyectó en el pronúcleo macho de ovocitos fertilizados y se transfirió un total de 689 embriones en madres de adopción. Estas sesiones de microinyección condujeron al nacimiento de 61 crías viables. La selección mediante PCR condujo a la identificación de un fundador hembra que portaba el constructo transgénico integrado en el genoma.

Una baja tasa de integración de constructo transgénico está con frecuencia asociada o bien con toxicidad de ovocitos o bien con un efecto fenotípico que es incompatible con el desarrollo embrionario.

- 20 En los ejemplos anteriores el constructo transgénico pTG-CAG-mQC se inyectó en el pronúcleo macho de 689 ovocitos fertilizados, dando como resultado la identificación de un fundador transgénico nacido, concretamente el animal n.º 37460. Se cruzó este fundador hembra con machos C57BL/6 generando ratones F1 que portaban el transgén CAG-mQC en su genoma.

A continuación se describe el trabajo realizado para el cruce hasta las fases de generación F1.

- 25 Ejemplo 6: Resumen de la fase de inyección de pronúcleo

6-1 Sesiones de inyección

Se aisló el constructo transgénico a partir del vector pTG-CAG-mQC, se clonó tal como se mostró anteriormente.

- 30 Se aislaron ovocitos receptores de hembras C57BL/6J embarazadas con un estado de salud SPF (específico y libre de patógenos). Se inyectó el ADN de transgén en el pronúcleo macho de 689 ovocitos fertilizados y volvieron a implantarse estos embriones manipulados en 23 hembras pseudoembarazadas OF1 con un estado de salud SOPF (específico y libre de patógenos oportunistas).

6-2 Fundadores transgénicos

Las sesiones de inyección dieron lugar a 69 crías nacidas, de las cuales 61 crías sobrevivieron el periodo de destete. Las 61 crías F1 viables se caracterizaron mediante las PCR de selección establecidas y sólo se identificó una hembra (n.º 37460, *25.05.05) que portaba el ADN transgénico integrado al azar en el genoma.

5 Ejemplo 7: Generación de animales F1

Se cruzó la hembra transgénica n.º 37460 con un macho C57BL/6 de tipo natural (estado de salud SOPF; específico y libre de patógenos oportunistas) a partir del 12 de julio de 2005 para establecer la línea de ratón CAG-mQC transgénico generando ratones transgénicos F1.

10 La tabla 8 a continuación resume los resultados del cruce F1 transgénico de 3 camadas. Desafortunadamente, la madre se comió a la primera camada, nacida el *05.08.05.

Tal como se documenta en la tabla 8 más del 50% de los animales nacidos F1 portan el transgén en su genoma lo que indica que el fundador transgénico puede transmitir el transgén a través de la capa germinal.

Tabla 8: Resumen del cruce de F1

N.º de camada	Fecha de nacimiento	N.º de crías nacidas	N.º de crías viables	F1 transgénicos macho	F1 transgénicos hembra
1	05.08.05	9	0 (comida)	-	-
2	16.09.05	9	9	1	4
3	26.10.05	9	8	2	3
en total		27	17	3	7

15 Ejemplo 8: Genotipado de la generación F1

Se prepararon biopsias de la punta de la cola de las 17 crías destetadas y se extrajo el ADN. Se genotiparon los ADN individuales mediante la PCR de selección transgénicas que se estableció tal como se mostró anteriormente. El par de cebadores CAG-Pr-F1/ GX1675-TOR1-FF (SEQ ID No: 4 y 6) amplifica la unión promotor-ADNc, proporcionando un producto de PCR de 1585 pb específico cuando el constructo transgénico se ha integrado en el genoma huésped.

20 Las secuencias de cebador y las condiciones de PCR optimizadas se indican en la tabla 9. Se confirmó la calidad del ADN usando cebadores específicos para un gen de control. La figura 8 muestra un ejemplo de los resultados de selección mediante PCR.

Tabla 9: Cebador de genotipado

Tipo de PCR	Nombre de cebador	Secuencia de cebador (5' -3')	Tamaño esperado	SEQ. NO.	ID
transgén	CAG-Pr-F1	GCTGGTTATTGTGCTGTCTCA	1585 pb	4	
	GX1675- TOR1-FF	TTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGC		6	

25

Mezcla de reacción			Reacción			
ADN genómico	~150,0 ng	Etapas	Temp.	Tiempo	Ciclos	
Par de cebadores	10,0 pmol	Desnaturalización	94°C	420 s	1x	
dNTP	0,35 mM	Desnaturalización	94°C	30 s	35x	
Tampón de reacción 3	0,1 Vol	Apareamiento	62°C	30 s		
Expansión larga (Roche)	2,5 U	Extensión	68°C	120 s		
Volumen de reacción	50,0 µl	Finalización	68°C	600 s	1x	

La selección mediante PCR de las 17 crías F1 dio como resultado la identificación de 10 animales transgénicos positivos.

Tabla 10: Genotipo de la generación F1 de la línea transgénica CAG-mQC

Genotipo	Generación	Fecha de nacimiento	Sexo	N.º de ratón
TG/+	FO	25.05.05	hembra	37460
TG/+	F1	16.09.05	macho	39771
TG/+	F1	16.09.05	hembra	39773, 39776, 39778, 39779
TG/+	F1	26.10.05	macho	30490, 30491
TG/+	F1	26.10.05	hembra	30492, 30495, 30496
WT	F1	16.09.05	macho	39772
WT	F1	16.09.05	hembra	39774, 39775, 39777
WT	F1	26.10.05	macho	30489
WT	F1	26.10.05	hembra	30493, 30494

- 5 Los ejemplos 6-8 resumen el trabajo realizado para el establecimiento de la línea de ratón transgénico CAG-mQC generada cruzando el fundador hembra n.º 37460 con machos C57BL/6.

El cruce de la hembra transgénica n.º 37460 dio como resultado el nacimiento de 3 camadas. Por desgracia, la madre se comió a la primera camada, nacida el *05.08.2005. El genotipado de las 2 camadas adicionales dio como resultado la identificación de 3 machos transgénicos y 7 hembras transgénicas entre las 17 crías F1 viables.

- 10 Por tanto, pudo completarse satisfactoriamente el cruce de F1 para la generación de una línea de ratón de Qpct ubicuamente sobreexpresado.

- 15 Los resultados de los siguientes ejemplos demuestran una sobreexpresión del gen diana. Se evaluó la expresión mediante determinación de la actividad de QC en EDTA-plasma y homogeneizados tisulares de hígado, riñón y cerebro. En EDTA-plasma, pbd17E3 mostró una actividad de QC específica 21 veces superior en comparación con miembros de la camada de tipo natural. La expresión de QC en los homogeneizados tisulares sólo se cuantificó de manera fiable para los animales tg, lo que sugiere de nuevo una sobreexpresión evidente.

- 20 En el cerebro, el hígado y el riñón, también se analizó la expresión del gen diana mediante RT-PCR y PCR en tiempo real. Por consiguiente, los resultados corroboran los resultados referentes a la actividad enzimática. En el cerebro y el hígado, se determinó una concentración de ARNm de 4 y 5 veces en comparación con el wt, respectivamente. El nivel de ARNm en el riñón aumentó drásticamente 66 veces.

Los datos demuestran la idoneidad de pbd17E3 para estudios adicionales referentes al papel de QC en condiciones fisiopatológicas, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, preferiblemente mediante cruce con modelos de animales establecidos o para la generación de modelos de ratón de AD adicionales.

- 25 El propósito de los siguientes ejemplos fue la determinación de la actividad de la enzima glutaminil ciclasa (QC) en ratones transgénicos heterocigóticos que se supone que sobreexpresan esta enzima. Para este fenotipado debe determinarse la actividad de glutaminil ciclasa en el cerebro, el hígado, el riñón y EDTA-plasma de dos animales transgénicos y dos controles de tipo natural con un antecedente genético igual. Además, debe examinarse la expresión de ARNm de QC en los órganos descritos. Todos los animales eran de sexo femenino.

Ejemplo 9: Material y métodos

- 30 9.1. Ensayo de HPLC para determinar la actividad de QC

- 35 Se evaluó la actividad de QC en el tejido de animales de tipo natural y transgénicos mediante cuantificación de la ciclación mediada por QC de glutaminil-beta-naftilamina para dar piroglutamil-beta-naftilamina mediante el uso de un ensayo basado en HPLC. Se llevó a cabo la medición usando un sistema de HPLC "La chrome", fabricado por Merck-Hitachi y una columna RP18 LiChro-CART 125-4 suministrada por Merck KGaA. Para la separación, se usó un gradiente de agua y acetonitrilo que contenía el 1% de TFA cada uno con PRT tal como sigue:

Tabla 9-1 Protocolo de HPLC para la medición de la actividad de QC en lisados tisulares y EDTA-plasma

Tiempo (min)	Eluyente A Acetonitrilo/ TFA(1%)	Eluyente B Agua/TFA (1%)
0	23	77
8	45	55
10	95	5
15	95	5
20	23	77

Se realizó la detección de glutaminil-beta-naftilamina y piroglutamil-beta-naftilamina usando un detector de red de diodos L7455 fabricado por Hitachi Corporation a una longitud de onda de 280 nm. Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Se calculó la concentración de piroglutamil-beta-naftilamina usando una curva patrón.

Ejemplo 9-1: Preparación de la muestra

Se realizaron determinaciones de la actividad de QC usando homogeneizados de cerebro, hígado, riñón y plasma. Se centrifugó el plasma a 4°C y 13000 xg durante 10 min y se aplicó para el ensayo de QC. Además, el plasma del grupo control pudo usarse directamente sin añadir agua para la medición (100 µl), mientras que el de los ratones transgénicos de QC se diluyó 1:25 usando tampón MOPS (25 mM, pH 7,0). Se mezcló tejido de cerebro, hígado y riñón en un volumen de 40 veces de tampón de lisis y se homogeneizó usando un homogeneizador Downs. El tampón de lisis (pH 7,5) consistía en Tris-base (10 mM), EDTA (5 mM), Triton (0,5%) y glicerina (10%).

Posteriormente, se trataron las muestras con un tubo de ultrasonidos (16 ciclos, intensidad del 70%) y posteriormente se centrifugaron (25 min, 13000 xg, 4°C). Se tomaron los sobrenadantes y se usaron inmediatamente para la medición (100 µl).

9.3. Determinación de la actividad de QC

Tras la preparación de la muestra, se llevó a cabo cada determinación de piroglutamil-beta-naftilamina según el siguiente protocolo, que fue idéntico para la medición de la curva patrón con enzima QC recombinante purificada y de los gráficos de producción con el tiempo con QC procedente de muestras tisulares homogeneizadas.

En un tubo de 1,5 ml, se mezclaron 500 µl de disolución de sustrato (glutaminil-beta-naftilamina 100 µM en tampón MOPS 25 mM, pH 7,0) con 400 µl de disolución de N-etil-maleimida (250 µM, en tampón MOPS 25 mM, pH 7,0) como inhibidor de cisteína proteasa. Se dejó que la mezcla se equilibrara a 30°C durante 10 min en un bloque térmico a 350 rpm. Tras el equilibrado, se inició la reacción mediante adición de 100 µl de lisado celular o plasma (diluido en el caso de tejido de animales transgénicos) hasta un volumen total de 1000 µl. Entonces se incubó la mezcla de reacción durante 45 min a 30°C a 350 rpm. Del volumen de reacción total, se retiraron muestras (100 µl) tras 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 35 y 45 min. Para detener la conversión en curso de glutaminil-beta-naftilamina a piroglutamil-beta-naftilamina, se calentaron inmediatamente estas muestras durante 5 min en agua en ebullición para inactivar la enzima glutaminil ciclasa. Posteriormente, se congelaron inmediatamente las muestras a -20°C. Se ejecutó el experimento en tres réplicas al mismo tiempo. Antes del análisis usando HPLC, todas las muestras se habían congelado una vez. Para la medición se descongelaron las muestras y después se centrifugaron durante 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente antes de iniciar el proceso de medición en el sistema de HPLC. Después, se diluyeron 1:1 25 µl de la muestra con agua doblemente destilada y se mezclaron. Se inyectó completamente esta disolución con una jeringuilla Hamilton de 100 µl en el bucle de muestra de 20 µl del sistema de HPLC. Entre las mediciones, se limpió la jeringuilla Hamilton dos veces con agua, dos veces con acetona y posteriormente de nuevo dos veces con agua. Antes de extraer la jeringuilla con una nueva muestra se aclaró dos veces (2 x 3 µl) con la nueva muestra.

Se convirtieron las áreas de picos resultantes para piroglutamil-beta-naftilamina (T_R : ~6,8 min, el tiempo de retención de glutaminil-beta-naftilamina era de T_R : ~4,85 min) en concentraciones de piroglutamil-beta-naftilamina mediante el uso de una curva patrón. Las cifras resultantes se trazaron en un diagrama de tiempo (eje x)-producción (eje y). Se calculó la velocidad inicial de la reacción que convierte glutaminil-beta-naftilamina en piroglutamil-beta-naftilamina mediante regresión lineal en la región de la formación de producto lineal, que se observó habitualmente durante los 20 primeros minutos de la reacción. Los diagramas y las velocidades iniciales resultantes se muestran a modo de ejemplo para la actividad de QC en el cerebro (véase la figura 9).

Ejemplo 10: actividad de QC en plasma con EDTA y homogeneizados tisulares

En el plasma de ratones transgénicos para QC hembra, se detectó un aumento de 21 veces de la actividad de QC

en referencia al volumen. En homogeneizados de tejido de hígado, la actividad de QC (en referencia al peso) era comparable a la del plasma de animales QC. Se observó un aumento de casi 3 veces de la actividad de QC en tejido de cerebro de ratones tg para QC en comparación con plasma de los animales transgénicos. No fue posible comparar las actividades QC medidas en tejidos de animales transgénicos con las de controles no transgénicos. En el grupo control, no se determinó la actividad de QC si la preparación de la muestra se realizó como con animales transgénicos para QC (dilución de 40 veces de los lisados). Por tanto, en teoría, se produciría un múltiplo infinito en la actividad de QC. Si se medían lisados tisulares de un grupo control en concentraciones superiores a 1:40, la mayoría de la glutaminil-beta-naftilamina suministrada a la reacción como sustrato para QC se perdió sin conversión en piroglutamil-beta-naftilamina. Por tanto, no era posible una determinación de la actividad de QC en tejidos de ratones control y sólo estaba disponible una comparación directa entre ratones control y transgénicos para QC para plasma con EDTA. En este caso, los ratones QC mostraron un aumento relativo de 21 veces de la actividad de QC. (Figuras 10 A y B).

10.2 Evaluación de los niveles de transcrito de QC usando PCR y PCR en tiempo real

Se aisló el ARNm total de tejido de hígado, riñón y cerebro mediante el uso del kit NucleoSpin (Macherey Nagel) según el protocolo de los fabricantes y después de eso se transcribió 1 µg de ARNm aislado en ADNc aplicando oligonucleótidos hexámeros aleatorios para el cebado.

Se realizó PCR cualitativa de todos los tejidos usando ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa, Promega) según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la reacción aplicando las siguientes condiciones: apareamiento: 57°C, 45 s; extensión: 72°C, 60 s; fusión: 95°C, 30 s. Se analizaron las muestras en un gel de agarosa al 1,4% en tampón TBE.

Tal como podría esperarse, se detectó una concentración notablemente superior de ARNm de QC de ratón en ratones transgénicos para QC en comparación con el grupo control (figura 10-C).

Para cuantificar la expresión de QC al nivel del ARNm, se realizó una RT-PCR en tiempo real usando un aparato "Rotor Gene 3000" de Corbett Research.

En cerebro, hígado y riñón, las concentraciones de ARNm de QC estaban fuertemente aumentadas en comparación con el grupo control (figura 10D). Se observó la máxima expresión en el riñón con un aumento de 66 veces de la concentración de ARNm de QC.

Ejemplo 11: Caracterización de ratones transgénicos que sobreexpresan QC humana de manera específica de neuronas.

Se generaron ratones transgénicos que sobreexpresan QC humana, dirigidos por el promotor Thy-1, esencialmente tal como se describe en los ejemplos 1-9 para ratones transgénicos que sobreexpresan QC murina de manera ubicua y se explica resumidamente además en el ejemplo 12.

Se criaron de manera cruzada eficazmente tres fundadores, y se caracterizó la expresión de QC usando ensayos de actividad de QC e inmunotransferencia de tipo Western aplicando anticuerpos específicos. Para la determinación de la actividad de QC, se homogeneizaron 50 mg de tejido de cerebro en 1 ml de tampón que consistía en Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM y Triton X-100 al 0,5% y glicerol al 10%. Se homogeneizó el tejido mediante varios golpes en homogeneizador Downs y se vertió en un tubo cónico de 12 ml. Entonces se sometió el homogeneizado a 3x 10 s de choque ultrasónico. Se centrifugó el homogeneizado resultante a 4°C durante 25 min y se determinó la actividad de QC del sobrenadante.

Se determinó la actividad hQC aplicando un ensayo de HPLC, esencialmente tal como se describe en el ejemplo 9. En resumen, las muestras consistían en 500 µl de sustrato (Q-βNA, concentración final de 50 µM), 400 µl de N-etilmaleimida (concentración final de 100 µM) y 100 µl de muestra que contiene QC. Se incubó la reacción a 30°C y se tomaron muestras tras 0, 5, 10, 15, 22, 30 y 45 min. Posteriormente, se terminó la reacción mediante incubación en un baño de agua en ebullición durante 5 min.

Tal como se ilustra en la figura 11, la muestra obtenida de un animal transgénico que portaba el transgén de hQC contenía una actividad de QC significativamente reducida en comparación con un compañero de camada no transgénico, demostrando claramente la expresión de hQC en los animales transgénicos.

Para validar adicionalmente la expresión de QC en animales transgénicos y para selección la línea fundadora que presentaba la máxima actividad de QC, se aplicó un segundo ensayo, que se basaba en determinación fluorométrica de la actividad enzimática (Schilling, *et al.*, Anal. Biochem. (2002) 303:49-56). Tal como se indica en la figura 12, se observó un aumento de 35 veces de la formación de pGlu-βNA en el homogeneizado de cerebro del ratón transgénico para hQC en comparación con el compañero de camada no transgénico, lo que demuestra la sobreexpresión de la enzima.

Se caracterizó la expresión de QC humana para tres líneas de ratón fundadoras diferentes (línea 53, 37 y 43) y la línea que sobreexpresaba QC murina pbd17E3, tal como se muestra en la figura 13A. Se detectó sobreexpresión

significativa de QC en todos los animales tg para hQC. En comparación, QC murina de pbd17E3 se expresaba menos en cerebro, provocado por los diferentes promotores usados (promotor CAG ubicuo en pbd17E3 y promotor específico de neuronas Thy-1 murino en ratones transgénicos para hQC). Basándose en estos resultados, la línea 53 fundadora de ratón transgénico para hQC presentaba la máxima expresión de QC (figura 13B).

- 5 Se confirmaron finalmente los resultados de los análisis de la actividad de QC mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo específico para QC (figura 14). Se observó la banda más prominente en muestras que se derivaban de la línea 53 de ratón transgénico para QC humana, que ya presentaba la máxima actividad enzimática. La línea 43 mostraba una señal media y la 37 la señal de QC más baja, correspondiente a una masa molecular de aproximadamente 32 kDa. Sólo se obtuvo una ligera señal con ratones pbd17E3, reflejando los resultados de la determinación de la actividad de QC en muestras de cerebro.

- 10 En resumen, basándose en la determinación de la QC mediante dos ensayos diferentes para la actividad enzimática y mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western, se logró una expresión eficaz de QC humana en ratones transgénicos. El promotor específico de neuronas desencadena así la expresión muy eficazmente. Por tanto, estos ratones son los más adecuados para el desarrollo de ratones transgénicos, con el fin de modelar los estados patológicos que están relacionados con QC y/o que se facilitan o aceleran por QC, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia británica familiar, demencia danesa familiar, enfermedad de Huntington.

Ejemplo 12: Generación de ratones transgénicos que sobreexpresan QC humana de manera específica de neuronas.

12.1 Establecimiento de plásmido transgénico y microinyección

- 20 Se usó el plásmido pcADN3.1-hQC que contiene el marco de lectura abierto de QC humana (entrada de swiss-prot Q16769) como molde para la amplificación por PCR del ADNc de hQC con los siguientes cebadores:

- mThy1-hQC-XhoI-F (5'-AAT AAT CTC GAG GCC ACC ATG GCA GGC GGA AGA CAC CG-3', SEQ ID No. 42)
- mThy1-hQC-BsrGI-R (5'-ACA TAT GTA CAT TAC AAA TGA AGA TA-3', SEQ ID No. 43).

- 25 Se digirió el producto de PCR con XhoI y BsrGI y se ligó con el plásmido de vector pUC18-mThy1 (figura 15). Se verificó el clon de plásmido correcto mediante restricción y secuenciación. Se linealizó el plásmido transgénico pUC18-mThy1-hQC con Pvu I y Not I para eliminar secuencias del plásmido. Se separó el fragmento de 7929 pb correspondiente al constructo transgénico de la estructura principal del vector mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó adicionalmente. Se eliminó la estructura principal del plásmido mediante digestión con Not I y Pvu I (figura 16). Se aplicó un fragmento de ADN de 7929 pb resultante para microinyección pronuclear en ovocitos F2 (C57BL/6 x CBA) seguido por reimplantación de como mínimo 150 ovocitos microinyectados viables en ratones pseudoembarazados.

12.2 Identificación de fundadores transgénicos

Se estableció una estrategia de selección por PCR usando los siguientes cebadores:

Cebador directo hQCFI: 5'-TCCTACAAGTCTTTGTGTTGGAA-3' (SEQ ID No. 37)

- 35 Cebador inverso mThy1R1: 5'-GAAGGACTTGGGGAGGGAG-3' (SEQ ID No. 38)

Sonda 13p: 5'-FAM-CAAGTAAGTCGAGGTCCTCCTCTGCA-TAMRA-3' (SEQ ID No. 39)

Además, se usó PCR de cabeza a cola para identificar la integración en tándem:

Cebador directo HTT-mthy1-F: 5'-AGCAAGCCTGGAAGACCTGGGA-3' (SEQ ID No. 40)

Cebador inverso HTT-mThy1-R: 5'-AGACTCAGCCCATCCACTCCTT-3 (SEQ ID No. 41).

- 40 Los fundadores identificados se enumeran en la tabla 12-1.

Fundador	color	sexo
Fo n.º q37	marrón	macho
Fo n.º 38	marrón	macho
Fo n.º 43	marrón	macho
Fo n.º 48	marrón	macho
Fo n.º 53	marrón	macho

Se realizó una PCR de cabeza a cola para investigar la integridad del constructo transgénico y múltiples copias transgénicas (cebadores HTT-mthy1-F y HTT-mthy1-R). Se obtuvieron los siguientes resultados:

- | | | |
|---|-----------|---|
| | Fo n.º 37 | banda de fragmento de PCR correcto débil |
| 5 | Fo n.º 38 | banda de fragmento de PCR correcto fuerte |
| | Fo n.º 43 | banda de fragmento de PCR correcto débil |
| | Fo n.º 48 | banda de fragmento de PCR correcto débil |
| | Fo n.º 53 | banda de fragmento de PCR correcto fuerte |
- 10 Este resultado conduce a la conclusión de que todos los fundadores tienen múltiples fragmentos transgénicos integrados en dirección en tándem (tal como se ilustra en la figura 3).
- Cuanto más constructos se combinen en orientación en tándem, más fuerte será la señal de la banda de PCR de cabeza a cola.
- 15 Todos los fundadores se criaron con compañeros de cría B6CBA. Se seleccionaron ratones F1 con el conjunto de sonda/cebadores de qPCR descrito anteriormente. Solo pudieron identificarse cachorros transgénicos para Fo n.º 37, Fo n.º 43 y Fo n.º 53. Todos los cachorros F1 de Fo n.º 38 y Fo n.º 48 eran no transgénicos.
- Se investigaron muestras de corteza (Co), hipocampo (Hi) y médula espinal (SC) de diferentes crías F1 transgénicas de Fo n.º 37, Fo n.º 43 y Fo n.º 53 (edad: de 2 a 3,5 meses) mediante RT-qPCR junto con un cachorro control no transgénico. Los resultados se muestran en la figura 17.
- Pudieron observarse los máximos niveles de ARNm en muestras de Fo n.º 53.
- 20 **Lista de secuencias**
- <110> Probiobdrug AG
- <120> MODELOS DE SELECCIÓN *IN VIVO* PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y OTROS TRASTORNOS RELACIONADOS CON QPCT
- <130> PBD 00061
- 25 <150> US 60/885.649
- <151> 19-01-2007
- <160> 43
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 30 <211> 661
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Nucleótido sintético
- 35 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> n se selecciona de A, C, G o T.
- <220>
- 40 <221> misc_feature

<222> (530)..(530)

<223> n se selecciona de A, C, G o T.

<400> 1

```

ncgggagatc ttctagctcg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg      60
gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaattggc      120

ccgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc      180
atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtatth acggtaaact      240
gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat      300
gacggtaaat ggcccgctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact      360
tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tcgaggtag cccacggtc      420
tgcttcactc tccccatctc cccccctcc ccaccccaa ttttgtatth atttatthtt      480
taattatthtt gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg ggggcgcgcn gggcggggcg      540
gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtag cggcggcagc caatcagagc      600
ggcgcgctcc gaaagtthtc ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag      660
c                                                                           661

```

5

<210> 2

<211> 1527

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Nucleótido sintético

<400> 2

ccaccttctg ccgccgccac cacagccact ttctcctctg cctccctcta ctgtcctcgc	60
cctctgtcga ggggcgcgcc gggatcccta gaccgcggct agaaagcttg atatcgaatt	120
cctgcatggc aggcagcgaa gacaagcgcg tcgtgggcac tctccacctg ctgctactgc	180
aggcgacagt cctgtctctg acagctggga atctgagtct ggtctccgct gcctggacgc	240
aggagaagaa ccaccaccaa ccagcacatt tgaattcttc atctcttcag caagttgcag	300
aaggcactag catttctgaa atgtggcaaa acgacttgag accattgctg atagaacgat	360
atcctggatc gcccgggaagc tattctgtctc gtcagcacat catgcaacga attcagagac	420
ttcaggctga gtgggtcgtg gaagttgaca ccttcctgag taggactccc tatggctatc	480
ggtccttctc aaatatcatc agcactctta acccgggaagc gaaacgacac ctggctcctc	540
cctgccacta cgactccaaa tattttcctc gatgggacag cagagtgttt gtgggagcca	600
cggattcagc tgtgccatgt gcaatgatgt tggaacttgc ccgtgcctta gacaagaaac	660
tccattcctt gaaggatgtc tctggttcca agccagatct ctactccag ctaattttct	720
ttgatggtga agaggctttt catcactggt cccctcaaga ttctctgtat gggctctggc	780
acttagctca gaagatggca tcaagccctc accctcctgg atcaagaggc accaaccaac	840
tggatggcat ggatctgttg gtcttactag atttaattgg agcagcaaat ccaacattcc	900
ctaatttttt cccaagact accagatggt ttaatagact tcaagcaatt gaaaaggaac	960
tctatgaatt gggattactc aaggatcatt ctttggagag gaagtatttt cagaattttg	1020
gctatggaaa tattatccag gatgaccaca ttccattttt aagaaaagggt gtcccagttc	1080
ttcacctgat agcttctcct ttccctgaag tctggcacac catggatgac aatgaagaaa	1140
atctacatgc gtcaaccatt gacaatctca acaaaatcat tcaagtcttt gtgttggaat	1200
atcttcactt gtaaaagcgc tctagagtat ccctcgagtc tagagggccc gtttaaacc	1260
gctgatcagc ctcgactgtg ccttctagt t gccagccatc tgttgtttgc ccctccccg	1320
tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttccctaataa aatgaggaaa	1380
ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca	1440
gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattgctgg ggatgcggtg ggctctatgg	1500
cttctgaggc ggaaagaacc agctggg	1527

<210> 3

<211> 22

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de ADN

<400> 3

10 ggtccgcgc acattcccc ga

<210> 4

<211> 21

22

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de ADN	
5	<400> 4	
	gctggttatt gtgctgtctc a	21
	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de ADN	
	<400> 5	
	gcttaatgcg ccgctaca	18
15	<210> 6	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de ADN	
	<400> 6	
	ttctttccgc ctcagaagcc atagagc	27
	<210> 7	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de ADN	
	<400> 7	
30	tgtaggtggc agagagacta	20
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de ADN	
	<400> 8	

ctgccaagta ggaaagtccc at

22

<210> 9

<211> 1089

<212> ADN

5 <213> *Mus musculus*

<400> 9

atggcaggca gcgaagacaa gcgcgtcgtg ggcactctcc acctgctgct actgcaggcg	60
acagtccctgt ctctgacagc tgggaatctg agtctggtct ccgctgcctg gacgcaggag	120
aagaaccacc accaaccagc acatttgaat tcttcatctc ttcagcaagt tgcagaaggc	180
actagcattt ctgaaatgtg gcaaaacgac ttgagaccat tgctgataga acgatatcct	240
ggatcgcccc gaagctattc tgctcgtcag cacatcatgc aacgaattca gagacttcag	300
gctgagtggg tcgtggaagt tgacaccttc ctgagtagga ctccctatgg ctatcgggtcc	360
ttctcaaata tcatcagcac tcttaacctg gaagcgaaac gacacctggc cctcgcctgc	420
cactacgact ccaaatattt tcctcgatgg gacagcagag tgtttggtgg agccacggat	480
tcagctgtgc catgtgcaat gatgttggaa cttgcccgtg ccttagacaa gaaactccat	540
tccttgaagg atgtctctgg ttccaagcca gatctctcac tccagctaatt tttctttgat	600
ggtgaagagg cttttcatca ctgggtcccct caagattctc tgtatgggtc tcggcactta	660
gctcagaaga tggcatcaag ccctcaccct cctggatcaa gaggcaccaa ccaactggat	720
ggcatggatc tgttggtctt actagattta attggagcag caaatccaac attcccataat	780
tttttcccca agactaccag atggtttaat agacttcaag caattgaaaa ggaactctat	840
gaattgggat tactcaagga tcattctttg gagaggaagt attttcagaa ttttggttat	900
ggaaatatta tccaggatga ccacattcca tttttaagaa aagggtgtccc agttcttcac	960
ctgatagctt ctcttttccc tgaagtctgg cacaccatgg atgacaatga agaaaatcta	1020
catgcgtcaa ccattgacaa tctcaacaaa atcattcaag tctttgtgtt ggaatatctt	1080
cacttgtaa	1089

<210> 10

<211> 362

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

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

Glu Met Trp Gln Asn Asp Leu Arg Pro Leu Leu Ile Glu Arg Tyr Pro
 65 70 75 80
 Gly Ser Pro Gly Ser Tyr Ser Ala Arg Gln His Ile Met Gln Arg Ile
 85 90 95
 Gln Arg Leu Gln Ala Glu Trp Val Val Glu Val Asp Thr Phe Leu Ser
 100 105 110
 Arg Thr Pro Tyr Gly Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ile Ile Ser Thr Leu
 115 120 125
 Asn Pro Glu Ala Lys Arg His Leu Val Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser
 130 135 140
 Lys Tyr Phe Pro Arg Trp Asp Ser Arg Val Phe Val Gly Ala Thr Asp
 145 150 155 160
 Ser Ala Val Pro Cys Ala Met Met Leu Glu Leu Ala Arg Ala Leu Asp
 165 170 175
 Lys Lys Leu His Ser Leu Lys Asp Val Ser Gly Ser Lys Pro Asp Leu
 180 185 190
 Ser Leu Arg Leu Ile Phe Phe Asp Gly Glu Glu Ala Phe His His Trp
 195 200 205
 Ser Pro Gln Asp Thr Leu Tyr Gly Ser Arg His Leu Ala Gln Lys Met
 210 215 220
 Ala Ser Ser Pro His Pro Pro Gly Ser Arg Gly Thr Asn Gln Leu Asp
 225 230 235 240
 Gly Met Asp Leu Leu Val Leu Leu Asp Leu Ile Gly Ala Ala Asn Pro
 245 250 255
 Thr Phe Pro Asn Phe Phe Pro Lys Thr Thr Arg Trp Phe Asn Arg Leu
 260 265 270
 Gln Ala Ile Glu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Gly Leu Leu Lys Asp His
 275 280 285
 Ser Leu Glu Arg Lys Tyr Phe Gln Asn Phe Gly Tyr Gly Asn Ile Ile
 290 295 300
 Gln Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Lys Gly Val Pro Val Leu His
 305 310 315 320
 Leu Ile Ala Ser Pro Ser Pro Glu Val Trp His Thr Met Asp Asp Asn
 325 330 335
 Glu Glu Asn Leu His Ala Ser Thr Ile Asp Asn Leu Asn Lys Ile Ile

	340	345	350	
	Gln Val Phe Val Leu Glu Tyr Leu His Leu			
	355	360		
	<210> 11			
	<211> 32			
	<212> ADN			
5	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Cebador de ADN			
	<400> 11			
	atatgcatgc atggcaggca gcgaagacaa gc			32
10	<210> 12			
	<211> 40			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
15	<223> Cebador de ADN			
	<400> 12			
	atataagctt ttacaagtga agatattcca acacaaagac			40
	<210> 13			
	<211> 33			
20	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Cebador de ADN			
	<400> 13			
25	atactcgaga aaagagcctg gacgcaggag aag			33
	<210> 14			
	<211> 31			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
30	<220>			
	<223> Cebador de ADN			
	<400> 14			
	atatctagat tacaagtga gatattccaa c			31

<210> 15

<211> 361

<212> PRT

<213> Ser humano

5 <400> 15

Met Ala Gly Gly Arg His Arg Arg Val Val Gly Thr Leu His Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Val Ala Ala Leu Pro Trp Ala Ser Arg Gly Val Ser Pro Ser
 20 25 30

Ala Ser Ala Trp Pro Glu Glu Lys Asn Tyr His Gln Pro Ala Ile Leu
 35 40 45

Asn Ser Ser Ala Leu Arg Gln Ile Ala Glu Gly Thr Ser Ile Ser Glu
 50 55 60

Met Trp Gln Asn Asp Leu Gln Pro Leu Leu Ile Glu Arg Tyr Pro Gly
 65 70 75 80

Ser Pro Gly Ser Tyr Ala Ala Arg Gln His Ile Met Gln Arg Ile Gln
 85 90 95

Arg Leu Gln Ala Asp Trp Val Leu Glu Ile Asp Thr Phe Leu Ser Gln
 100 105 110

Thr Pro Tyr Gly Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ile Ile Ser Thr Leu Asn
 115 120 125

Pro Thr Ala Lys Arg His Leu Val Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys
 130 135 140

Tyr Phe Ser His Trp Asn Asn Arg Val Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser
 145 150 155 160

Ala Val Pro Cys Ala Met Met Leu Glu Leu Ala Arg Ala Leu Asp Lys
 165 170 175

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

Leu Gln Leu Ile Phe Phe Asp Gly Glu Glu Ala Phe Leu His Trp Ser
195 200 205

Pro Gln Asp Ser Leu Tyr Gly Ser Arg His Leu Ala Ala Lys Met Ala
210 215 220

Ser Thr Pro His Pro Pro Gly Ala Arg Gly Thr Ser Gln Leu His Gly
225 230 235 240

Met Asp Leu Leu Val Leu Leu Asp Leu Ile Gly Ala Pro Asn Pro Thr
245 250 255

Phe Pro Asn Phe Phe Pro Asn Ser Ala Arg Trp Phe Glu Arg Leu Gln
260 265 270

Ala Ile Glu His Glu Leu His Glu Leu Gly Leu Leu Lys Asp His Ser
275 280 285

Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Gln Asn Tyr Ser Tyr Gly Gly Val Ile Gln
290 295 300

Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val Pro Val Leu His Leu
305 310 315 320

Ile Pro Ser Pro Phe Pro Glu Val Trp His Thr Met Asp Asp Asn Glu
325 330 335

Glu Asn Leu Asp Glu Ser Thr Ile Asp Asn Leu Asn Lys Ile Leu Gln
340 345 350

Val Phe Val Leu Glu Tyr Leu His Leu
355 360

<210> 16

<211> 382

<212> PRT

5 <213> Ser humano

<400> 16

Met Arg Ser Gly Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg
1 5 10 15

Gly Leu Met Glu Pro Leu Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

Val Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ala Val Gly Ser Ala Phe
35 40 45

Tyr Thr Ile Trp Ser Gly Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu Pro Leu
 50 55 60
 Gly Arg Glu Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu Ala Arg
 65 70 75 80
 Leu Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Ser Thr
 85 90 95
 Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn
 100 105 110
 Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Arg Ser Leu Thr Ala
 115 120 125
 Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu Gly
 130 135 140
 Pro Val Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ala Ala
 145 150 155 160
 Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Pro Pro
 165 170 175
 Gly Ser Thr Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys Ala
 180 185 190
 Leu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Leu Glu Leu Ser Arg Ala
 195 200 205
 Lys Lys Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp Gly
 210 215 220
 Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly Ser
 225 230 235 240
 Arg His Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly Pro
 245 250 255
 Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu Gly
 260 265 270
 Ala Pro Asn Pro Thr Phe Tyr Ser His Phe Pro Arg Thr Val Arg Trp
 275 280 285
 Phe His Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn Leu
 290 295 300
 Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu Pro
 305 310 315 320
 Phe Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val

325

330

335

Pro Val Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His Thr
340 345 350

Pro Ala Asp Thr Glu Val Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn Leu
355 360 365

Cys Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 17

<211> 364

<212> PRT

5 <213> Ser humano

<400> 17

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

Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Leu Glu Leu Ser Arg Ala Lys Lys
 180 185 190
 Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp Gly Glu Glu
 195 200 205
 Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly Ser Arg His
 210 215 220
 Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly Pro Thr Arg
 225 230 235 240
 Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu Gly Ala Pro
 245 250 255
 Asn Pro Thr Phe Tyr Ser His Phe Pro Arg Thr Val Arg Trp Phe His
 260 265 270
 Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn Leu Leu Gln
 275 280 285
 Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu Pro Phe Gly
 290 295 300
 Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val Pro Val
 305 310 315 320
 Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His Thr Pro Ala
 325 330 335
 Asp Thr Glu Val Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn Leu Cys Arg
 340 345 350
 Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
 355 360

<210> 18

<211> 382

<212> PRT

5 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 18

Met Arg Ser Gly Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg
 1 5 10 15

Gly Val Met Glu Pro Leu Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
 20 25 30

Val Arg Leu₃₅ Leu Pro Leu Leu₄₀ Ala Leu Ala Val Gly₄₅ Ser Ala Phe
 Tyr Thr₅₀ Ile Trp Ser Gly₅₅ Trp His Arg Arg Thr Glu₆₀ Glu Leu Pro Leu
 Gly₆₅ Arg Glu Leu Arg Val₇₀ Pro Leu Ile Gly₇₅ Ser Leu Pro Glu Ala Arg₈₀
 Leu Arg Arg Val₈₅ Val Gly Gln Leu Asp₉₀ Pro Gln Arg Leu Trp Gly₉₅ Thr
 Tyr Leu Arg Pro₁₀₀ Leu Leu Val Val Arg₁₀₅ Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn₁₁₀
 Leu Gln Val₁₁₅ Arg Lys Phe Leu Glu₁₂₀ Ala Thr Leu Arg Ser₁₂₅ Leu Thr Ala
 Gly Trp₁₃₀ His Val Glu Leu Asp₁₃₅ Pro Phe Thr Ala Ser₁₄₀ Thr Pro Leu Gly
 Pro Val₁₄₅ Asp Phe Gly Asn₁₅₀ Val Val Ala Thr Leu Asp₁₅₅ Pro Gly Ala Ala₁₆₀
 Arg His Leu Thr₁₆₅ Leu Ala Cys His Tyr Asp₁₇₀ Ser Lys Leu Phe Pro₁₇₅ Pro
 Gly Ser Thr Pro₁₈₀ Phe Val Gly Ala Thr₁₈₅ Asp Ser Ala Val Pro₁₉₀ Cys Ala
 Leu Leu₁₉₅ Leu Glu Leu Ala Gln Ala₂₀₀ Leu Asp Leu Glu Leu₂₀₅ Ser Arg Ala
 Lys Glu₂₁₀ Gln Ala Ala Pro Val₂₁₅ Thr Leu Gln Leu Leu₂₂₀ Phe Leu Asp Gly
 Glu Glu Ala Leu Lys Glu₂₃₀ Trp Gly Pro Lys Asp₂₃₅ Ser Leu Tyr Gly Ser₂₄₀
 Arg His Leu Ala Gln₂₄₅ Leu Met Glu Ser Ile₂₅₀ Pro His Ser Pro Gly₂₅₅ Pro
 Thr Arg Ile Gln₂₆₀ Ala Ile Glu Leu Phe₂₆₅ Met Leu Leu Asp Leu₂₇₀ Leu Gly
 Ala Pro Asn₂₇₅ Pro Thr Phe Tyr Ser₂₈₀ His Phe Pro Arg Thr₂₈₅ Val Arg Trp
 Phe His₂₉₀ Arg Leu Arg Ser Ile₂₉₅ Glu Lys Arg Leu His₃₀₀ Arg Leu Asn Leu

Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu Pro
305 310 315 320

Phe Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val
325 330 335

Pro Val Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His Thr
340 345 350

Pro Ala Asp Thr Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn Leu
355 360 365

Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 19

<211> 382

<212> PRT

5 <213> *Macaca mulatta*

<400> 19

Met Arg Ser Gly Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg
1 5 10 15

Gly Val Met Glu Pro Leu Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

Val Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ala Val Gly Ser Ala Phe
35 40 45

Tyr Thr Ile Trp Ser Gly Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu Pro Leu
50 55 60

Gly Arg Glu Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu Ala Arg
65 70 75 80

Leu Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Gly Thr
85 90 95

Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn
100 105 110

Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Arg Ser Leu Thr Ala
115 120 125

Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu Gly
130 135 140

Pro Val Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala Ala

145		150		155		160									
Arg	His	Leu	Thr	Leu 165	Ala	Cys	His	Tyr	Asp 170	Ser	Lys	Leu	Phe	Pro 175	Pro
Gly	Ser	Thr	Pro 180	Phe	Val	Gly	Ala	Thr 185	Asp	Ser	Ala	Val	Pro 190	Cys	Ala
Leu	Leu	Leu 195	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala 200	Leu	Asp	Leu	Glu	Leu 205	Ser	Arg	Ala
Lys	Glu 210	Gln	Ala	Ala	Pro	Val 215	Thr	Leu	Gln	Leu	Leu 220	Phe	Leu	Asp	Gly
Glu 225	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu 230	Trp	Gly	Pro	Lys	Asp 235	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ser 240
Arg	His	Leu	Ala	Gln 245	Leu	Met	Glu	Ser	Ile 250	Pro	His	Ser	Pro	Gly 255	Pro
Thr	Arg	Ile	Gln 260	Ala	Ile	Glu	Leu	Phe 265	Met	Leu	Leu	Asp	Leu 270	Leu	Gly
Ala	Pro	Asn 275	Pro	Thr	Phe	Tyr	Ser 280	His	Phe	Pro	Arg	Thr 285	Val	Arg	Trp
Phe	His 290	Arg	Leu	Arg	Ser	Ile 295	Glu	Lys	Arg	Leu	His 300	Arg	Leu	Asn	Leu
Leu 305	Gln	Ser	His	Pro	Gln 310	Glu	Val	Met	Tyr	Phe 315	Gln	Pro	Gly	Glu	Pro 320
Phe	Gly	Ser	Val	Glu 325	Asp	Asp	His	Ile	Pro 330	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly 335	Val
Pro	Val	Leu 340	His	Leu	Ile	Ser	Thr	Pro 345	Phe	Pro	Ala	Val	Trp 350	His	Thr
Pro	Ala	Asp 355	Thr	Glu	Ala	Asn	Leu 360	His	Pro	Pro	Thr	Val 365	His	Asn	Leu
Ser	Arg 370	Ile	Leu	Ala	Val	Phe 375	Leu	Ala	Glu	Tyr	Leu 380	Gly	Leu		

<210> 20

<211> 383

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 20

Met Pro Ser Gly Gly Arg Gly Arg Ser Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg
1 5 10 15

Gly Leu Leu Glu Pro Pro Ser Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

Ala His Phe Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Ser Ala
35 40 45

Thr Tyr Thr Ile Trp Ser Gly Trp His His Gln Thr Glu Glu Leu Pro
50 55 60

Arg Gly Arg Glu Leu Arg Gly Arg Leu Ile Gly Ser Leu Ser Glu Ala
65 70 75 80

Arg Leu Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro His Arg Leu Trp Asn
85 90 95

Thr Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly
100 105 110

Asn Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Arg Thr Leu Thr
115 120 125

Ala Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Leu Thr Pro Leu
130 135 140

Gly Pro Leu Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ala Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Ala
165 170 175

Ser Glu Ser Val Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Arg Glu Leu Ser Arg
195 200 205

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

Gly Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Thr Asp Ser Leu Tyr Gly
225 230 235 240

Ser Arg His Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ala Pro His Ser Pro Gly
245 250 255

Pro Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu
260 265 270

Gly Ala Pro Asn Pro Asn Phe Tyr Ser His Phe Pro His Thr Ala Arg
275 280 285

Trp Phe His Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Met Asn
290 295 300

Leu Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Pro Pro Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly
325 330 335

Val Pro Val Leu His Leu Ile Ser Met Pro Phe Pro Ser Val Trp His
340 345 350

Thr Pro Asp Asp Ser Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn
355 360 365

Leu Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 21

<211> 383

<212> PRT

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 21

Met Ser Pro Ala Ser Arg Gly Arg Ser Arg Gln Arg Leu Gly Asp Arg
1 5 10 15

Gly Leu Met Lys Pro Pro Ser Leu Ser Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

Val Gln Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Gly Leu Ala
35 40 45

Phe Tyr Ile Val Trp Asn Ser Trp His Pro Gly Val Glu Glu Val Ser
50 55 60

Arg Ser Arg Asp Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Ser Glu Ala
65 70 75 80

Lys Leu Arg Leu Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Gly
85 90 95

Thr Phe Leu Arg Pro Leu Leu Ile Val Arg Pro Pro Gly Ser Pro Gly
100 105 110

Asn Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Gln Ser Leu Ser
 115 120 125
 Ala Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu
 130 135 140
 Gly Pro Leu Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala
 145 150 155 160
 Ala Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Phe Phe Pro
 165 170 175
 Pro Gly Leu Pro Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys
 180 185 190
 Ala Leu Leu Leu Glu Leu Val Gln Ala Leu Asp Val Met Leu Ser Arg
 195 200 205
 Ile Lys Gln Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp
 210 215 220
 Gly Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Ser Arg His Leu Ala Gln Ile Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly
 245 250 255
 Pro Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Val Leu Leu Asp Leu Leu
 260 265 270
 Gly Ala Pro Ser Pro Ile Phe Phe Ser His Phe Pro Arg Thr Ala Arg
 275 280 285
 Trp Phe Gln Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn
 290 295 300
 Leu Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu
 305 310 315 320
 Pro Pro Gly Pro Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly
 325 330 335
 Val Pro Val Leu His Leu Ile Ala Met Pro Phe Pro Ala Val Trp His
 340 345 350
 Thr Pro Ala Asp Thr Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn
 355 360 365
 Leu Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
 370 375 380

<210> 22

<211> 383

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5 <400> 22

Met Ser Pro Gly Ser Arg Gly Arg Pro Arg Gln Arg Leu Glu Asp Arg
 1 5 10 15
 Gly Leu Met Lys Pro Pro Ser Leu Ser Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
 20 25 30
 Val Gln Phe Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ala Met Gly Leu Ala
 35 40 45
 Phe Tyr Ile Val Trp Asn Ser Trp His Pro Gly Val Glu Glu Met Ser
 50 55 60
 Arg Ser Arg Asp Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Ser Glu Ala
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Leu Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Gly
 85 90 95
 Thr Phe Leu Arg Pro Leu Leu Ile Val Arg Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Gln Ser Leu Ser
 115 120 125
 Ala Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu
 130 135 140
 Gly Pro Leu Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala
 145 150 155 160
 Ala Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Phe Phe Pro
 165 170 175
 Pro Gly Leu Pro Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys
 180 185 190
 Ala Leu Leu Leu Glu Leu Val Gln Ala Leu Asp Ala Met Leu Ser Arg
 195 200 205
 Ile Lys Gln Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp
 210 215 220
 Gly Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly
 225 230 235 240

Ser Arg His Leu Ala Gln Ile Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly
245 250 255
Pro Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Val Leu Leu Asp Leu Leu
260 265 270
Gly Ala Ser Ser Pro Ile Phe Phe Ser His Phe Pro Arg Thr Ala Arg
275 280 285
Trp Phe Gln Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn
290 295 300
Leu Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320
Pro Pro Gly Pro Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly
325 330 335
Val Pro Val Leu His Leu Ile Ala Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His
340 345 350
Thr Pro Ala Asp Thr Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn
355 360 365
Leu Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 23

<211> 383

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<400> 23

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

Arg Val Arg Arg Val₈₅ Val Gly Gln Leu Asp₉₀ Pro His Arg Leu Trp₉₅ Asn
 Thr Phe Leu Arg₁₀₀ Pro Leu Leu Val₁₀₅ Val Arg Thr Pro Gly Ser₁₁₀ Pro Gly
 Asn Leu Gln₁₁₅ Val Arg Lys Phe Leu₁₂₀ Glu Ala Thr Leu Arg₁₂₅ Thr Leu Ser
 Ala Gly₁₃₀ Trp His Ile Glu₁₃₅ Leu Asp Ser Phe Thr Ala₁₄₀ Ser Thr Pro Val
 Gly₁₄₅ Pro Leu Asp Phe Ser₁₅₀ Asn Val Val Ala Thr₁₅₅ Leu Asp Pro Gly Ala₁₆₀
 Ala Arg His Leu Thr₁₆₅ Leu Ala Cys His Tyr₁₇₀ Asp Ser Lys Leu Phe₁₇₅ Pro
 Ser Asp Ser Ala₁₈₀ Pro Phe Val Gly Ala₁₈₅ Thr Asp Ser Ala Val₁₉₀ Pro Cys
 Ser Leu Leu₁₉₅ Leu Glu Leu Ala Gln₂₀₀ Ala Leu Asp Gln Glu₂₀₅ Leu Gly Lys
 Ala Lys₂₁₀ Glu Arg Ala Ala Pro₂₁₅ Met Thr Leu Gln Leu₂₂₀ Ile Phe Leu Asp
 Gly₂₂₅ Glu Glu Ala Leu Lys₂₃₀ Gln Trp Gly Pro Lys₂₃₅ Asp Ser Leu Tyr Gly₂₄₀
 Ser Arg His Leu Ala₂₄₅ Gln Leu Met Glu Ser₂₅₀ Thr Pro His Gly Leu₂₅₅ Gly
 Ser Thr Arg Ile₂₆₀ Gln Ala Ile Glu Leu₂₆₅ Phe Met Leu Leu Asp₂₇₀ Leu Leu
 Gly Ala Pro₂₇₅ Asn Pro Thr Phe Tyr₂₈₀ Ser His Phe Pro Arg₂₈₅ Thr Ala Arg
 Trp Phe His Arg Leu Arg Ser₂₉₅ Ile Glu Lys Arg Leu₃₀₀ His Arg Leu Asn
 Leu Leu Gln Ser His Pro₃₁₀ Trp Glu Val Met Tyr₃₁₅ Phe Gln Thr Gly Glu₃₂₀
 Pro Pro Gly Ser Val₃₂₅ Glu Asp Asp His Ile₃₃₀ Pro Phe Leu Arg Arg₃₃₅ Gly
 Val Pro Val Leu₃₄₀ His Leu Ile Ala Thr₃₄₅ Pro Phe Pro Ser Val₃₅₀ Trp His

Thr Ser Asp Asp Ser Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn
355 360 365

Leu Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 24

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Ser humano

<400> 24

Val Trp Tyr Arg Phe Gln Gly Lys Ala Ala Met Arg Ser Gly Gly Arg
1 5 10 15

Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg Gly Leu Met Glu Pro Leu
20 25 30

Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg Val Arg Leu Leu Pro Leu
35 40 45

Leu Leu Ala Leu Ala Val Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Ile Trp Ser Gly
50 55 60

Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu Pro Leu Gly Arg Glu Leu Arg Val
65 70 75 80

Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu Ala Arg Leu Arg Arg Val Val Gly
85 90 95

Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Ser Thr Tyr Leu Arg Pro Leu Leu
100 105 110

Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn Leu Gln Val Arg Lys Phe
115 120 125

Leu Glu Ala Thr Leu Arg Ser Leu Thr Ala Gly Trp His Val Glu Leu
130 135 140

Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu Gly Pro Val Asp Phe Gly Asn
145 150 155 160

Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ala Ala Arg His Leu Thr Leu Ala
165 170 175

Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Pro Pro Gly Ser Thr Pro Phe Val
180 185 190

Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys Ala Leu Leu Leu Glu Leu Ala

195					200					205					
Gln	Ala	Leu	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Ala	Lys	Lys	Gln	Ala	Ala	Pro
	210					215					220				
Val	Thr	Leu	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Asp	Gly	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu
	225				230					235					240
Trp	Gly	Pro	Lys	Asp	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ser	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Leu
				245					250					255	
Met	Glu	Ser	Ile	Pro	His	Ser	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Ile	Gln	Ala	Ile
			260					265					270		
Glu	Leu	Phe	Met	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Asn	Pro	Thr	Phe
		275					280					285			
Tyr	Ser	His	Phe	Pro	Arg	Thr	Val	Arg	Trp	Phe	His	Arg	Leu	Arg	Ser
	290					295					300				
Ile	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Arg	Leu	Asn	Leu	Leu	Gln	Ser	His	Pro	Gln
	305				310					315					320
Glu	Val	Met	Tyr	Phe	Gln	Pro	Gly	Glu	Pro	Phe	Gly	Ser	Val	Glu	Asp
				325					330					335	
Asp	His	Ile	Pro	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Val	Pro	Val	Leu	His	Leu	Ile
			340					345					350		
Ser	Thr	Pro	Phe	Pro	Ala	Val	Trp	His	Thr	Pro	Ala	Asp	Thr	Glu	Val
		355					360					365			
Asn	Leu	His	Pro	Pro	Thr	Val	His	Asn	Leu	Cys	Arg	Ile	Leu	Ala	Val
	370					375					380				
Phe	Leu	Ala	Glu	Tyr	Leu	Gly	Leu	Arg	Ala	Trp	Pro	Met	Thr	Val	Glu
	385				390					395					400
Arg	Thr	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser	Glu	Ala	Gln	Ala
				405					410					415	
Gly	Ser	Ala	Gly	Val	Leu	Val	Cys	Pro	Phe	His	Thr	Phe	Val	Ser	Leu
			420					425					430		
Cys	Tyr	Asn	Trp	Lys	Thr	Phe	Phe	Leu	Leu	Ile	Val	Ser	Ser	Cys	His
		435				440						445			
Pro	Ser	Arg	Thr	Gly	Lys	Arg	Pro	Leu	Trp	Asp	Asp	Ser	Gln	Arg	Asn
	450					455					460				
Lys	Asn	Leu	Leu	Pro	Pro	Gln	Arg	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Val	Cys	Arg
	465				470					475					480

Asp

<210> 25

<211> 359

<212> PRT

5 <213> Ser humano

<400> 25

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

Arg Leu Asn Leu Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln
 210 215 220
 Pro Gly Glu Pro Phe Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu
 225 230 235 240
 Arg Arg Gly Val Pro Val Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala
 245 250 255
 Val Trp His Thr Pro Ala Asp Thr Glu Val Asn Leu His Pro Pro Thr
 260 265 270
 Val His Asn Leu Cys Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu
 275 280 285
 Gly Leu Arg Ala Trp Pro Met Thr Val Glu Arg Thr Val Arg Glu Lys
 290 295 300
 Val Pro Ala Gly Ala Ser Glu Ala Gln Ala Gly Ser Ala Gly Val Leu
 305 310 315 320
 Val Cys Pro Phe His Thr Phe Val Ser Leu Cys Tyr Asn Trp Lys Thr
 325 330 335
 Phe Phe Leu Leu Ile Val Ser Ser Cys His Pro Ser Arg Thr Gly Lys
 340 345 350
 Arg Pro Leu Trp Asp Asp Ser
 355

<210> 26

<211> 1086

<212> ADN

5 <213> Ser humano

<400> 26

atggcaggcg gaagacaccg gcgcgtcgtg ggcaccctcc acctgctgct gctgggtggcc	60
gccctgccct gggcatccag gggggtcagt ccgagtgcct cagcctggcc agaggagaag	120
aattaccacc agccagccat tttgaattca tcggctcttc ggcaaattgc agaaggcacc	180
agtatctctg aaatgtggca aaatgactta cagccattgc tgatagagcg atacccggga	240
tcccctggaa gctatgctgc tcgtcagcac atcatgcagc gaattcagag gcttcaggct	300
gactgggtct tggaaataga caccttcttg agtcagacac cctatgggta ccggtctttc	360
tcaaatatca tcagcaccct caatcccact gctaaacgac atttggtcct cgcctgccac	420
tatgactcca agtatTTTTT ccaactggaac aacagagtgt ttgtaggagc cactgattca	480
gccgtgccat gtgcaatgat gttggaactt gctcgtgcct tagacaagaa actcctttcc	540

ttaaagactg	tttcagactc	caagccagat	ttgtcactcc	agctgatctt	ctttgatggg	600
gaagaggctt	ttcttctactg	gtctcctcaa	gattctctct	atgggtctcg	acacttagct	660
gcaaagatgg	catcgacccc	gcacccacct	ggagcgagag	gcaccagcca	actgcatggc	720
atggatttat	tgggtcttatt	ggatttgatt	ggagctccaa	acccaacggt	tcccaatttt	780
tttccaaact	cagccagggtg	gttcgaaaga	cttcaagcaa	ttgaacatga	acttcatgaa	840
ttgggtttgc	tcaaggatca	ctctttggag	gggcggtatt	tccagaatta	cagttatgga	900
ggtgtgattc	aggatgacca	tattccattt	ttaagaagag	gtgttccagt	tctgcatctg	960
ataccgtctc	ctttccctga	agtctggcac	accatggatg	acaatgaaga	aaatttggat	1020
gaatcaacca	ttgacaatct	aaacaaaatc	ctacaagtct	ttgtgttgga	atatcttcat	1080
ttgtaa						1086

<210> 27

<211> 1149

<212> ADN

5 <213> Ser humano

<400> 27

atgcgttccg	ggggccgcgg	gcgacccgc	ctgcggctgg	gggaacgtgg	cctcatggag	60
ccactcttgc	cgccgaagcg	ccgcctgcta	ccgcgggttc	ggctcttgcc	tctgttgctg	120
gcgctggccg	tgggctcggc	gttctacacc	atttggagcg	gctggcaccg	caggactgag	180
gagctgccgc	tgggcccggga	gctgcgggtc	ccattgatcg	gaagcctccc	cgaagcccgg	240
ctgcggaggg	tgggtgggaca	actggatcca	cagcgctctt	ggagcactta	tctgcgcccc	300
ctgctgggtg	tgcgaacccc	gggcagcccg	ggaaatctcc	aagtcagaaa	gttcctggag	360
gccacgctgc	ggtccctgac	agcaggttgg	cacgtggagc	tggatccctt	cacagcctca	420
acacccttgg	ggccagtgga	ctttggcaat	gtggtggcca	cactggaccc	aagggtctgc	480
cgtcacctca	cccttgccctg	ccattatgac	tcgaagctct	tcccacccgg	atcgaccccc	540
ttttagggg	ccacggattc	ggctgtgccc	tgtgccctgc	tgctggagct	ggcccaagca	600
cttgacctgg	agctgagcag	ggccaaaaaa	caggcagccc	cggtgaccct	gcaactgctc	660
ttcttggatg	gtgaagaggc	gctgaaggag	tggggaccca	aggactccct	ttacgggtcc	720
cggcacctgg	cccagctcat	ggagtctata	cctcacagcc	ccggccccac	caggatccag	780
gctattgagc	tctttatgct	tcttgatctc	ctgggagccc	ccaatcccac	cttctacagc	840
cacttccctc	gcacggtccg	ctggttccat	cggctgagga	gcattgagaa	gcgtctgcac	900
cgtttgaacc	tgctgcagtc	tcacccccag	gaagtgatgt	acttccaacc	cggggagccc	960
tttggctctg	tgggaagacga	ccacatcccc	ttcctccgca	gaggggtacc	cgtgctccat	1020
ctcatctcca	cgcccttccc	tgctgtctgg	cacacccctg	cggacaccga	ggtcaatctc	1080

cacccaccca cggtacacaa cttgtgccgc attctcgctg tgttcctggc tgaatacctg 1140
gggctctag 1149

<210> 28

<211> 1145

<212> ADN

5 <213> Ser humano

<400> 28

atgcgttccg ggggccgcgg gcgacccgc ctgcggctgg gggaacgtgg atggagccac 60
tcttgccgcc gaagcgccgc ctgctaccgc gggttcggct cttgcctctg ttgctggcgc 120
tggccgtggg ctgcggcttc tacaccattt ggagcggctg gcaccgcagg actgaggagc 180
tgccgctggg ccgggagctg cgggtcccat tgatcggaag cctccccgaa gcccggctgc 240
ggaggggtgtt gggacaactg gatccacagc gtctctggag cacttatctg cgccccctgc 300
tggttgtgag aaccccgggc agcccggaag atctccaagt cagaaagttc ctggaggcca 360
cgctgcggtc cctgacagca ggttggcacg tggagctgga tcccttcaca gcctcaacac 420
ccctggggcc agtggacttt ggcaatgtgg tggccacact ggaccaagg gctgcccgtc 480
acctcaccct tgccctgcat tatgactcga agctcttccc acccgatcg acccccttg 540
taggggccac ggattcggct gtgccctgtg ccctgctgct ggagctggcc caagcacttg 600
acctggagct gagcagggcc aaaaaacagg cagccccggt gaccctgcaa ctgctcttct 660
tggatggtga agaggcgtg aaggagtggg gacccaagga ctccctttac ggttcccggc 720
acctggccca gtcctatgag tctatactc acagccccg cccaccagg atccaggcta 780
ttgagctctt tatgcttctt gatctcctgg gagccccaa tcccaccttc tacagccact 840
tccctcgcac ggtccgctgg ttccatcggc tgaggagcat tgagaagcgt ctgcaccgtt 900
tgaacctgct gcagtctcat ccccggaag tgatgtactt ccaacccggg gagcccttg 960
gctctgtgga agacgaccac atcccccttc tccgcagagg ggtaccctg ctccatctca 1020
tctccacgcc ctccctgct gtctggcaca ccctgcgga caccgaggtc aatctccacc 1080
cacccacggt acacaacttg tgccgcattc tcgctgtgtt cctggctgaa tacctggggc 1140
tctag 1145

<210> 29

<211> 1149

10 <212> ADN

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 29

atgcgttccg ggggccgcgg gcggccccgc ctgcggctag gggaacgtgg cgttatggag

60

ccactcttgc	ccccgaagcg	ccgcctgcta	ccgcgggttc	ggctcttgcc	cctgttgctg	120
gcgctggccg	tggtctcggc	gttctacacc	atttgagcg	gctggcaccg	caggactgag	180
gagctgccgc	tggtccggga	gctgcgggtc	ccgttgatcg	gaagccttcc	cgaagcccgg	240
ctgcggaggg	tggtgggaca	actggacca	cagcgtctct	ggggcactta	tctgcgcccc	300
ctgctgggtg	tgcgaacccc	aggcagcccc	ggaaatctcc	aagtcagaaa	gttcctggag	360
gccacgctgc	ggcccttgac	agcagggttg	cacgtggagc	tggatccctt	cacagcctcg	420
acgcccctgg	ggccagtggg	ctttggcaat	gtgggtggcca	cgctggaccc	gggggctgcc	480
cgtcacctca	cccttgccctg	ccattatgac	tcgaagctct	tcccacccgg	atcgaccccg	540
tttgtagggg	ccacggactc	ggctgtgccc	tgtgccctgc	tgctggagct	ggcccaggca	600
cttgacctgg	agctgagcag	ggccaaagaa	caggcagccc	cggtgaccct	gcaactgctc	660
ttcctggatg	gtgaagaggc	gctgaaggag	tggggaccca	aggactccct	ttacggttcc	720
cggcacctgg	cccagctcat	ggagtctata	cctcatagcc	ccggccccac	caggatccag	780
gctattgagc	tctttatgct	tcttgatctc	ctgggagccc	ccaatccac	cttctacagc	840
cacttccctc	gcacgggtccg	ctggttccat	cggctgagaa	gcattgagaa	gcgtctgcac	900
cgtttgaacc	tgctgcagtc	tcatccccag	gaagtgatgt	acttccaacc	cggggagccc	960
ttcggctctg	tggaagacga	ccacatcccc	ttcctccgca	gaggggtccc	cgtgctccat	1020
ctcatctcta	cgcccttccc	tgctgtcttg	cacacccctg	cggacacaga	ggccaatctc	1080
cacccgcca	cggtacacaa	cttaagccgc	attctggccg	tgttcctggc	tgaatacctg	1140
gggctctag						1149

<210> 30

<211> 1149

<212> ADN

5 <213> *Macaca mulatta*

<400> 30

atgcgttccg	ggggccgcgg	gcggccccgc	ctgcggctag	gggaacgtgg	cgttatggag	60
ccactcttgc	ccccgaagcg	ccgcctgcta	ccgcgggttc	ggctcttgcc	cctgttgctg	120
gcgctggccg	tggtctcggc	gttctacacc	atttgagcg	gctggcaccg	caggactgag	180
gagctgccgc	tggtccggga	gctgcgggtc	ccgttgatcg	gaagccttcc	cgaagcccgg	240
ctgcggaggg	tggtgggaca	actggacca	cagcgtctct	ggggcactta	tctgcgcccc	300
ctgctgggtg	tgcgaacccc	aggcagcccc	ggaaatctcc	aagtcagaaa	gttcctggag	360
gccacgctgc	ggcccttgac	agcagggttg	cacgtggagc	tggatccctt	cacagcctcg	420
acgcccctgg	ggccagtggg	ctttggcaat	gtgggtggcca	cgctggaccc	gggggctgcc	480
cgtcacctca	cccttgccctg	ccattatgac	tcgaagctct	tcccacccgg	atcgaccccg	540

```

tttgtagggg ccacagactc ggctgtgccc tgtgccctgc tgctggagct ggcccaggca 600
cttgacctgg agctgagcag ggccaaagaa caggcagccc cggtgaccct gcaactgctc 660
ttcctggatg gtgaagaggc gctgaaggag tggggaccca aggactccct ttacggttcc 720
cggcacctgg ccagctcat ggagtctata cctcatagcc ccggccccac caggatccag 780
gctattgagc tctttatgct tcttgatctc ctgggagccc ccaatcccac cttctacagc 840
cacttccctc gcacgggtccg ctgggtccat cggctgagaa gcattgagaa gcgctctgcac 900
cgtttgaacc tgctgcagtc tcatccccag gaagtgatgt acttccaacc cggggagccc 960
tttggctctg tggaagacga ccacatcccc ttctccgca gaggggtccc cgtgctccat 1020
ctcatctcta cgcccttccc tgctgtctgg cacaccctg cggacacaga ggccaatctc 1080
caccgcccc cggtagacaa ctaagccgc attctggccg tgttcctggc tgaataacctg 1140
gggctctag 1149

```

<210> 31

<211> 1152

<212> ADN

5 <213> *Canis familiaris*

<400> 31

```

atgccctccg ggggccgagg ggggtcccg ctacggctcg gggaacgtgg cctcttggag 60
ccgccctccc cgccaagcg ccgctgctc ccgcgggagc acttcttgcc tctgcttctg 120
ctggccctgg ccctggcttc ggcgacctac accatctgga gcggctggca ccaccagact 180
gaggagctgc cgcggggagg ggagctgagg ggcgcttga tcggaagcct ctccgaagcc 240
cggctgcggc ggggtggggg gcaactggac ccacaccgtc tctggaacac ttatctgcgc 300
cccctgctgg ttgtgcggac ccggggcagc ccgggcaatc tccaagtcag aaagtccctg 360
gaggctacac tacggacctt gacagcaggc tggcatgtgg aactggaccc cttcacagcc 420
ttgacacccc tggggccact ggactttggc aatgtggtgg ccacgctgga ccaggggct 480
gcccgtcacc tcacccttgc ctgccattat gactccaagc tcttcgcatc tgagtcggtt 540
ccctttgtgg gggcaacaga ttcggctgta ccttgcgccc tgctgctgga gctggctcag 600
gccctcgaca gggagttgag tagggccaag gagcaggaag ccccggtgac tctgcagctg 660
ctctttttgg atggtgaaga agcactgaag gaggggggac ccacagactc cctctatggc 720
tcccggcacc tggccagct catggagtct gcacccaca gccggggccc caccaggatc 780
caggctatcg agctcttcat gctccttgat ctctgggtg ccccgaaatcc aaacttctac 840
agtcacttcc ctcatacagc ccgctgggtc catcggtga ggagcatcga gaagcgcctt 900
caccgcatga acctgctgca gtctcatccc caggaagtga tgtacttcca gccgggggag 960
ccccctgggt ctgtggaaga tgaccacatc cccttctctc gccgaggggt ccctgtgctc 1020
cacctcatct ccatgccctt cccctccgtc tggcacaccc ccgatgactc tgaggccaac 1080

```

ctgcacccac ccaccgtaca caatctgagc cgcacccctcg ccgtgttcct ggccgaatat 1140
ctggggctct ag 1152

<210> 32

<211> 1152

<212> ADN

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 32

atgagtcgga ccagccgcgg gcgggtctcg cagcggctcg gggatcgagg cctcatgaaa 60
ccaccctcac tttccaagcg ccgtcttctg ccgcgggtgc agctcctgcc cctgctgctg 120
ctggcgctgg ccctgggctt ggctttttat atcgtctgga atagctggca ccctgggggtt 180
gaggaggtat cacggagccg ggatctgagg gtcccgcgtg tcggaagcct ttcagaagcc 240
aagctgcggc ttgtggtagg gcagctggat ccacagcgct tctggggaac ttttctgcgt 300
cccttgttga ttgtacgacc ccaggtagt cctggcaatc tccaagttag aaagttcctg 360
gaggctacgt tgcagtcctt atcggcaggc tggcacgtgg aactggacct attcacagcc 420
tcaacccctt tggggccact ggacttcggg aacgtggtgg ccacccttga ccaggagct 480
gcccgtcacc tcaccctcgc ctgccattat gactctaagt tcttccttcc tgggttaccc 540
ccctttgtgg gggccacaga ttcagccgtg ccctgtgccc tgcttctgga gttagtccag 600
gcccttgatg tcatgctgag cagaatcaag cagcaggcag caccagttag cctgcagctg 660
ctcttcttgg acggggagga ggcactgaag gaggggggac caaaggactc cctctatggt 720
tcccggcacc tagctcagat catggagtct ataccgcaca gccctggccc caccaggatc 780
caggctattg agctctttgt ctttcttgac cttctgggag cggccagtcc aatcttcttc 840
agtcacttcc ccgcacagc ccgtggttc caacgactgc ggagcatcga gaagcgctt 900
caccgtctga acctactgca gtctaccccc caggaagtga tgtacttcca acccggggag 960
ccccctggcc ctgtggaaga tgaccacatc cccttccttc gcagaggggt cccggtgctc 1020
cacctcattg cgatgccctt ccctgccgtg tggcacacac ctgctgacac tgaggctaac 1080
ctccaccgcg ccacggtgca caacctgagc cgcacccctcg ccgtgttcct ggctgagtac 1140
ctgggtctct ag 1152

<210> 33

<211> 1152

10 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 33

atgagtgccg ggagccgcgg gcggccccgg cagcggctcg aggatcgtgg cctcatgaaa 60
ccaccctcac ttccaagcg ccgtcttctg ccgcgagtg agttcctgcc cctgctgctg 120
ctggcgctgg ctatgggctt ggctttctat atcgtctgga acagctggca ccctgggggtt 180
gaggagatgt cacggagccg ggatctgcgg gtcccgcgtg tcggaagcct ttcagaagcc 240
aagctgcggc tggtagtagg gcagctggat ccgcagcgtc tctggggaac tttcctgcgt 300
cccttattga ttgtgcgacc cccgggtagt tctggcaatc tccaagttag aaagttcctg 360
gaggctacgt tgcagtcctt gtcggcaggc tggcatgttg aactggaccc attcacggcc 420
tcaacccctt tggggccact ggacttcggg aacgtgggtg ccacacttga cccaggagct 480
gcccgtcacc tcaccctcgc ctgccattat gactctaagt tcttccctcc ggggttgccc 540
ccctttgtgg gggccacaga ttcagctgtg ccctgtgccc tgcttctgga gttggtccag 600
gcccttgatg ccatgctgag cagaatcaag cagcaggcag caccggtgac cctgcagctg 660
cttttcttgg atggggagga ggcactgaag gagtggggac caaaggactc cctctatggc 720
tcccggcacc tagctcagat catggagtct ataccacaca gccctggccc caccaggatc 780
caggctattg agctctttgt cctcctcgac cttctgggag catccagtcc gatcttcttc 840
agtcacttcc ctgcacagc ccgctgggtc cagcgactga ggagcattga gaagcgcctt 900
caccggctga acctactgca gtctcaccac caggaagtga tgtacttcca acccggggag 960
ccccccggcc ctgtggaaga tgaccacatc cccttccttc gcagaggggt cccggtgctc 1020
cacctcattg ccacgccctt ccctgtgtgt tggcacacac ctgctgacac cgaggccaac 1080
ctccaccac ccactgtgca taacctgagc cgcaccttg ctgtgttcct ggccgagtac 1140
ctgggactct ag 1152

<210> 34

<211> 1152

<212> ADN

5 <213> *Bos taurus*

<400> 34

atgccttccg ggggccgcgg gcggccccgg ctccaggctg gggaacgcag ccttttggag 60
cgaccctcac cgccaagcg ccgcctgata ccgcgggcac agctgttgcc ccagctgctg 120
ctggctctga cggtagctc ggtgttctat accatttga ggatctggca tagccagact 180
gaagagctac cgctggggcg ggagctgcgg ggcccttga tcggaagcct ccccgaagct 240
cgggtgcgga gggtagtggg gcaactggac cctcaccgtc tctggaacac tttcctgcgc 300
cctctgctgg ttgtacggac tccgggcagc ccgggcaatc tccaagttag aaagttcctg 360
gaggctacgc tgcggacact ttcagcaggc tggcatatag aactcgactc cttcactgcc 420
tccacaccg tggggccatt ggacttcagc aatgtgggtg ccacgtgga cccaggggct 480
gcccgccacc ttacccttgc ctgccattat gactccaagc tcttccatc tgactcagcc 540

```

ccctttgtgg gggccacgga ttcggcagtg ccttgctccc tgctactgga gctggcccaa 600
gcccttgacc aggagctggg caaagccaag gagagggcag cgccaatgac cttgcagctg 660
atcttcctgg atggtgaaga ggcactgaag cagtggggac ccaaggactc gctttatggc 720
tcccggcacc tggcccagct catggagtct acacccacg gcctgggctc caccaggatc 780
caggctattg agctctttat gcttcttgat ctctgggag cccccaaccc gaccttctac 840
agtcacttcc ctgcacggc ccgctgggtc catcggctca ggagcattga gaagcgctg 900
caccgtctga acctcctgca gtctcatcct tgggaagtga tgtacttcca gaccggggag 960
ccccccggct ccgtggaaga cgaccacatc ccgttcctcc gccgaggagt tcccgtgctc 1020
cacctcatcg ccacaccctt cccctctgtc tggcacacgt ccgatgactc cgaggccaac 1080
ctgcacccac ccacggtaca caacctgagc cgcctcctgg ccgtgttcct ggctgagtac 1140
ctggggctct ag 1152

```

<210> 35

<211> 1457

<212> ADN

5 <213> Ser humano

<400> 35

```

gtctggtaca ggtttcaggg caaagcggcc atgcgttccg ggggccgcgg gcgaccccg 60
ctgcggctgg gggaacgtgg cctcatggag ccactcttgc cgccgaagcg ccgcctgcta 120
ccgcgggttc ggctcttgcc tctgttgctg gcgctggccg tgggctcggc gttctacacc 180
atttgagcgg gctggcaccg caggactgag gagctgccgc tgggccggga gctgcgggtc 240
ccattgatcg gaagcctccc cgaagcccgg ctgcggaggg tgggtgggaca actggatcca 300
cagcgtctct ggagcactta tctgcgcccc ctgctggttg tgcgaacccc gggcagcccc 360
ggaaatctcc aagtcagaaa gttcctggag gccacgctgc ggtccctgac agcaggttgg 420
cacgtggagc tggatccctt cacagcctca acacccctgg ggccagtgga ctttggaat 480
gtggtggcca cactggaccc aagggtgctc cgtcacctca cccttgctg ccattatgac 540
tcgaagctct tcccacccgg atcgaccccc tttgtagggg ccacggattc ggctgtgccc 600
tgtgccctgc tgctggagct ggcccaagca cttgacctgg agctgagcag ggccaaaaaa 660
caggcagccc cggtgaccct gcaactgctc ttcttgatg gtgaagaggc gctgaaggag 720
tggggacca aggactccct ttacggttcc cggcacctgg ccagctcat ggagtctata 780
cctcacagcc ccggccccac caggatccag gctattgagc tctttatgct tcttgatctc 840
ctgggagccc ccaatcccac cttctacagc cacttccctc gcacgggtccg ctggttccat 900
cggctgagga gcattgagaa gcgtctgcac cgtttgaacc tgctgcagtc tcatccccag 960
gaagtgatgt acttccaacc cggggagccc tttggctctg tgggaagacga ccacatcccc 1020

```

ttcctccgca	gaggggtacc	cgtgctccat	ctcatctcca	cgcccttccc	tgctgtctgg	1080
cacaccctg	cggacaccga	ggtcaatctc	caccacacca	cggtaacaaa	cttgtgccgc	1140
attctcgctg	tgttcctggc	tgaataacctg	gggctctagc	gtgcttggcc	aatgactgtg	1200
gagaggactg	tgagagagaa	ggccccagcg	ggggccagtg	aagctcaggc	aggatctgcc	1260
taggggtgtgc	tggtttgtcc	ttttcataacc	tttgtctcct	aattgtgcta	caattggaag	1320
accttctttc	ttttgattgt	ctcaagctgc	cacccttcaa	ggacagggaa	gagaccactg	1380
tgggatgaca	gccagaggaa	taagaacttg	ctccctcccc	agaggtaaac	acttgggtcca	1440
aaggtttgca	gggacca					1457

<210> 36

<211> 1088

<212> ADN

5 <213> Ser humano

<400> 36

agcggccatg	cgttccgggg	gccgcggggc	accccgccctg	cggctggggg	aacgtggcct	60
catggagcca	ctcttgccgc	cgaagcgccg	cctgctaccg	cgggttcggc	tcttgccctt	120
gttgctggcg	ctggccgtgg	gctcggcggt	ctacaccatt	tgagcgggt	ggcaccgcag	180
gactgaggag	ctgccgctgg	gccgggagct	gcgggtccca	ttgatcggaa	gcctccccga	240
agcccggctg	cggaggggtg	tgggacaact	ggatccacag	cgtctctgga	gcacttatct	300
gcgccccctg	ctggttgtgc	gaaccccggg	cagcccggga	aatctccaag	tcagaaaggc	360
agccccggtg	accctgcaac	tgctcttctt	ggatgggtgaa	gaggcgctga	aggagtgggg	420
accaagggac	tccctttacg	gttcccggca	cctggcccag	ctcatggagt	ctatacctca	480
cagccccggc	cccaccagga	tccaggctat	tgagctcttt	atgcttcttg	atctcctggg	540
agcccccaat	cccaccttct	acagccactt	ccctcgcacg	gtccgctggt	tccatcggt	600
gaggagcatt	gagaagcgtc	tgcaccgttt	gaacctgctg	cagtctcatc	cccaggaagt	660
gatgtacttc	caacccgggg	agcccttttg	ctctgtggaa	gacgaccaca	tccccttctt	720
ccgcagaggg	gtacccgtgc	tccatctcat	ctccacgccc	ttccctgctg	tctggcacac	780
ccctgcggac	accgaggtca	atctccaccc	acccacggta	cacaacttgt	gccgcattct	840
cgtgtgtgtc	ctggctgaat	acctggggct	ctagcgtgct	tggccaatga	ctgtggagag	900
gactgtgaga	gagaagggtc	cagcgggggc	cagtgaagct	caggcaggat	ctgcctaggg	960
tgtgctgggt	tgctcttttc	atacctttgt	ctcctaattg	tgctacaatt	ggaagacctt	1020
ctttcttttg	attgtctcaa	gctgccaccc	ttcaaggaca	gggaagagac	cactgtggga	1080
tgacagcc						1088

<210> 37

<211> 23

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 37	
	tcctacaagt cttgtgttg gaa	23
5	<210> 38	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador de PCR	
	<400> 38	
	gaaggacttg gggaggag	19
	<210> 39	
	<211> 27	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 39	
20	caagtaagtc gagtccttc ctctgca	27
	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 40	
	agcaagcctg gaagacctgg ga	22
	<210> 41	
30	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
35	<400> 41	
	agactcagcc catccactcc tt	22
	<210> 42	

	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de PCR	
	<400> 42	
	aataatctcg aggccacat ggcaggcgga agacaccg	38
	<210> 43	
	<211> 26	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 43	
15	acatatgtac attacaaatg aagata	26

REIVINDICACIONES

1. Animal transgénico no humano que sobreexpresa glutaminil ciclasa que comprende células que contienen un transgén de ADN que codifica para glutaminil ciclasa.
2. Animal transgénico no humano según la reivindicación 1, siendo el animal heterocigoto para el transgén.
- 5 3. Animal transgénico no humano según la reivindicación 1, siendo el animal homocigoto para el transgén.
4. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, siendo el animal un ratón.
5. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el transgén es de origen murino.
- 10 6. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el transgén es de origen humano.
7. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el transgén es un gen recombinante.
8. Animal transgénico no humano según la reivindicación 7, en el que el transgén recombinante codifica para un polipéptido quimérico o humanizado.
- 15 9. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el transgén codifica para una isoenzima de glutaminil ciclasa.
10. Animal transgénico no humano según la reivindicación 9, en el que la isoenzima es una proteína seleccionada del grupo que consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 15-25.
- 20 11. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el transgén codifica para un fragmento de la secuencia de aminoácidos de glutaminil ciclasa o una secuencia de glutaminil ciclasa modificada, en el que dicho fragmento o secuencia modificada conserva la función del polipéptido de glutaminil ciclasa de longitud completa.
12. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el transgén está operativamente unido a un promotor específico de tejido.
- 25 13. Método de selección de agentes biológicamente activos que inhiben o promueven la producción de glutaminil ciclasa *in vivo*, que comprende:

determinar el efecto de un agente de prueba ya administrado sobre la cantidad de glutaminil ciclasa producida en el animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 30 14. Célula o línea celular que contiene un transgén de ADN que codifica para glutaminil ciclasa y que sobreexpresa glutaminil ciclasa, que se deriva del animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
15. Ratón transgénico que sobreexpresa glutaminil ciclasa, que comprende una secuencia de nucleótidos transgénica que codifica para glutaminil ciclasa operativamente unida a un promotor, integrada en el genoma del ratón, demostrando el ratón un fenotipo que puede revertirse o mejorarse con un inhibidor de glutaminil ciclasa.
- 35 16. Ratón según la reivindicación 15, siendo el ratón heterocigoto para glutaminil ciclasa.
17. Ratón según la reivindicación 15, siendo el ratón homocigoto para glutaminil ciclasa.
18. Ratón según la reivindicación 15, en el que la secuencia transgénica codifica para glutaminil ciclasa murina.
- 40 19. Ratón según la reivindicación 15, en el que la secuencia transgénica codifica para glutaminil ciclasa humana.
20. Ratón según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el transgén codifica para una isoenzima de glutaminil ciclasa.
21. Ratón según la reivindicación 20, en el que la isoenzima es una proteína seleccionada del grupo que consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 15-25.
- 45 22. Ratón según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el transgén codifica para un fragmento de la secuencia de aminoácidos de glutaminil ciclasa o una secuencia de glutaminil ciclasa modificada, en el que dicho fragmento o secuencia modificada conserva la función del polipéptido de glutaminil ciclasa de

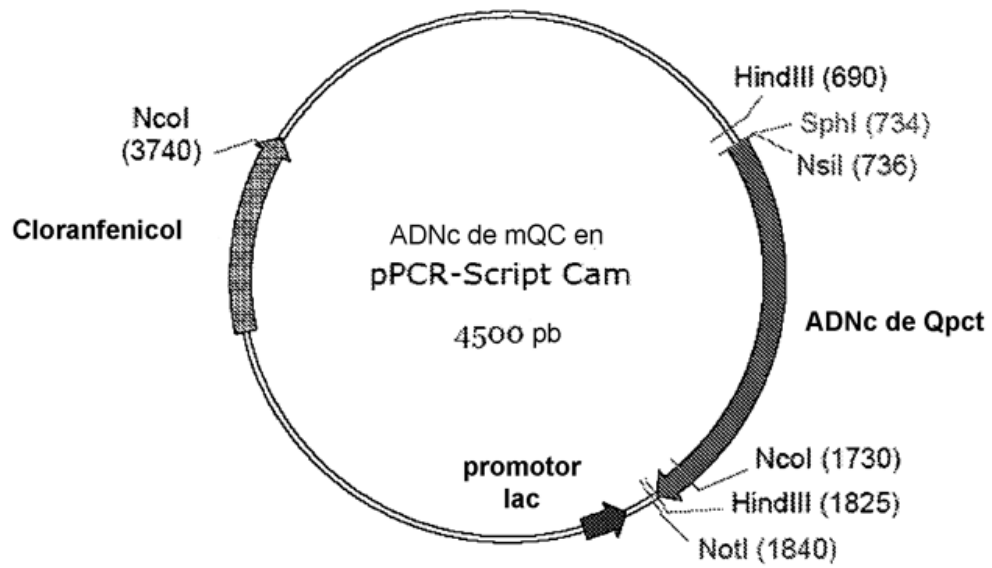
longitud completa.

23. Método de selección de agentes terapéuticos que inhiben o promueven la actividad glutaminil ciclasa que comprende

- 5
- (a) evaluar los efectos de agentes de prueba ya administrados sobre el fenotipo neurológico del ratón según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, y
 - (b) seleccionar un agente de prueba que inhibe o promueve la actividad glutaminil ciclasa.

FIGURA 1

A



B

Secuencia de la unión estructura principal del vector - ADNc

				SphI					

				NsiI					

701	TTCCTGC	AGCCCGGGG	ATCCGCCCGC	ATGCATGSCA	GGCAGCGRAG				ADNc de Qpct
	AAGGACG	TCGGGCCCCC	TAGGCGGGCG	TACGTACCGT	CCGTGGCTTC				
				M A G S E..					Proteína

FIGURA 2

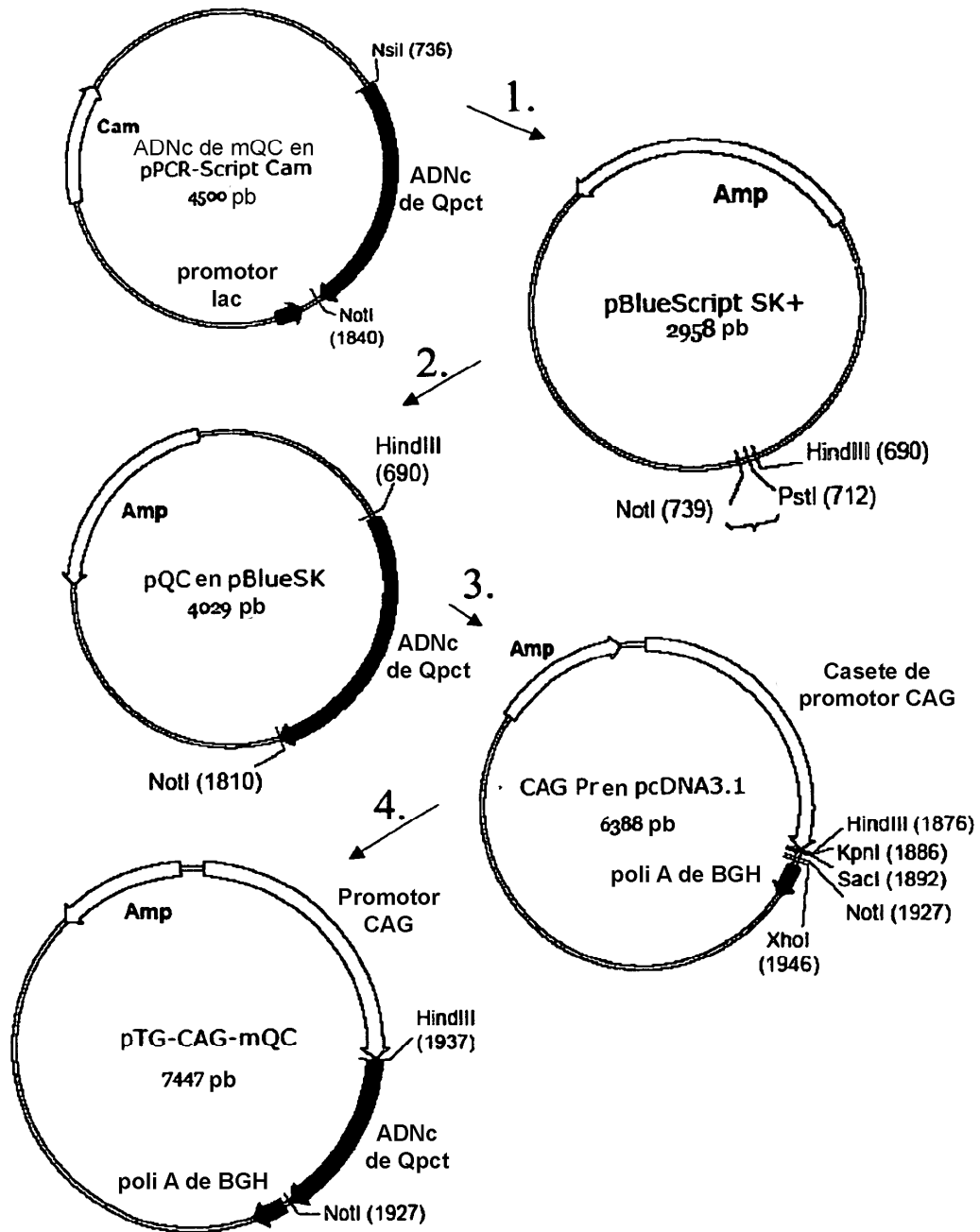


FIGURA 3

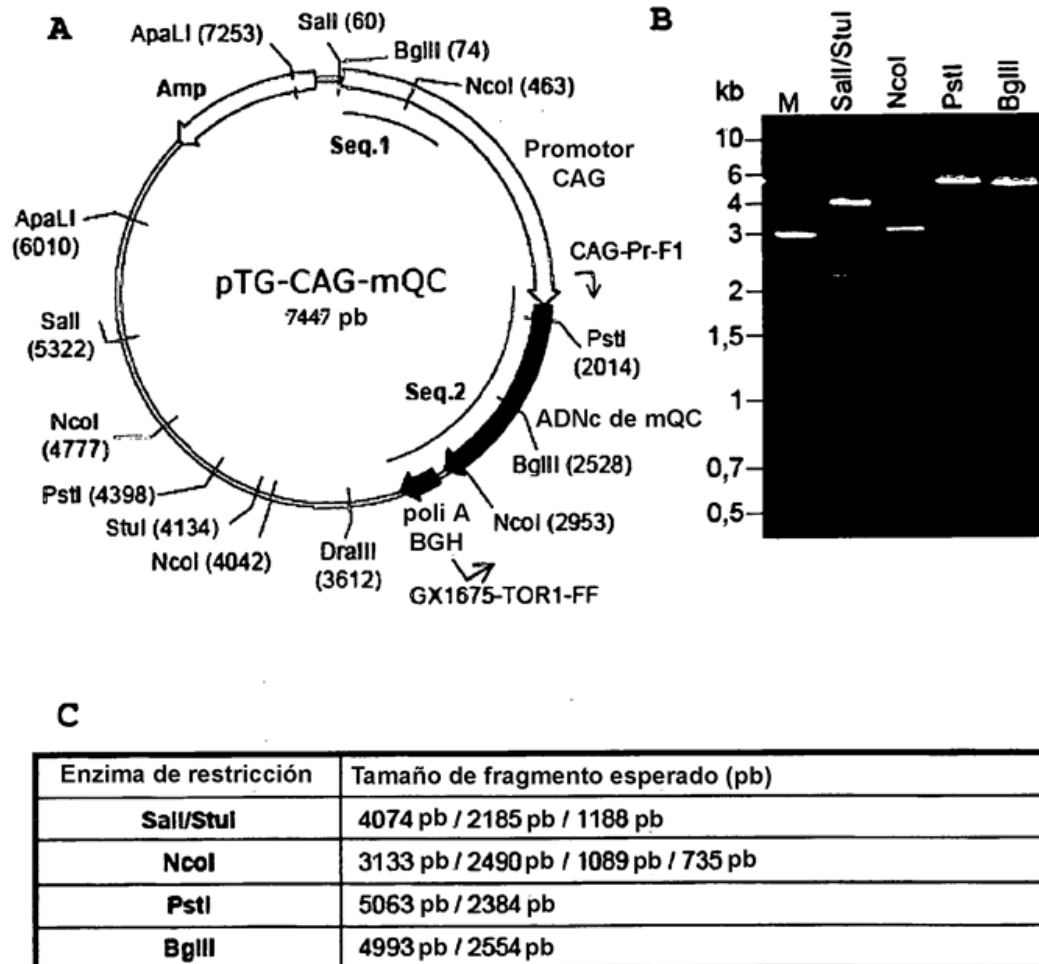


FIGURA 4

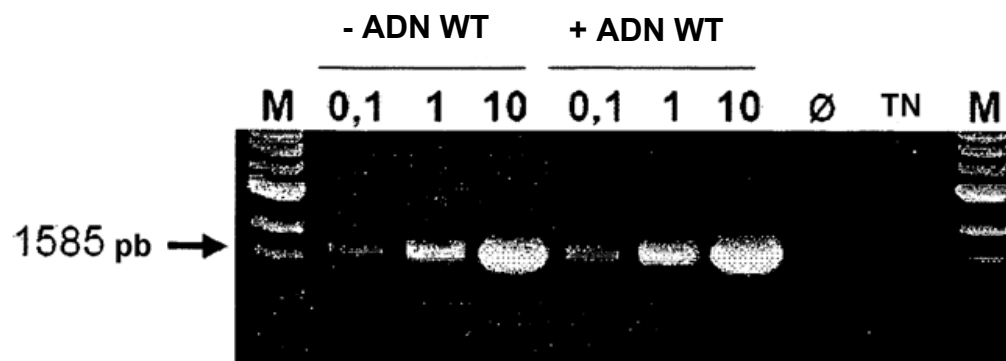
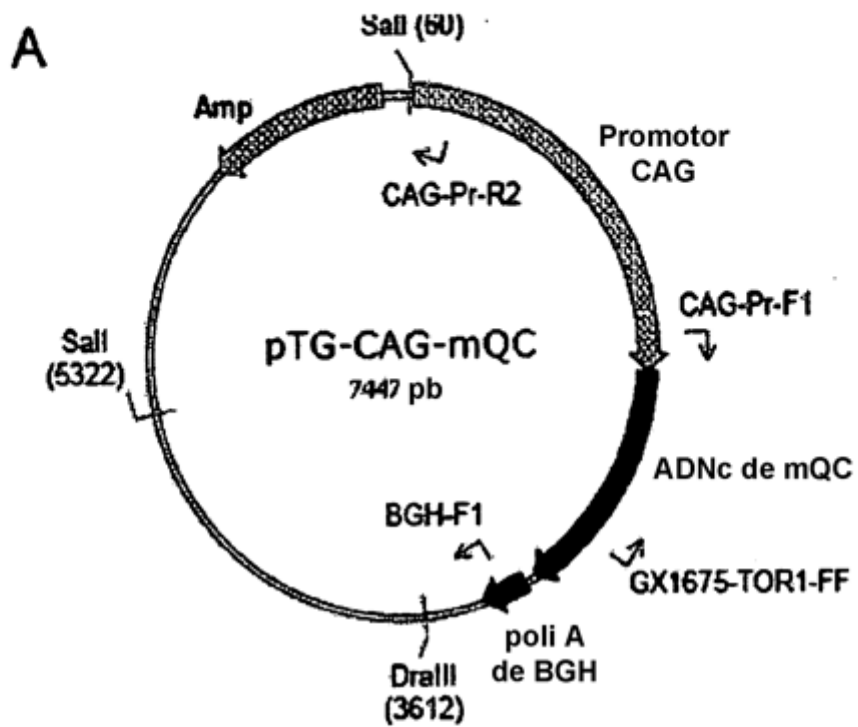


FIGURA 5



B

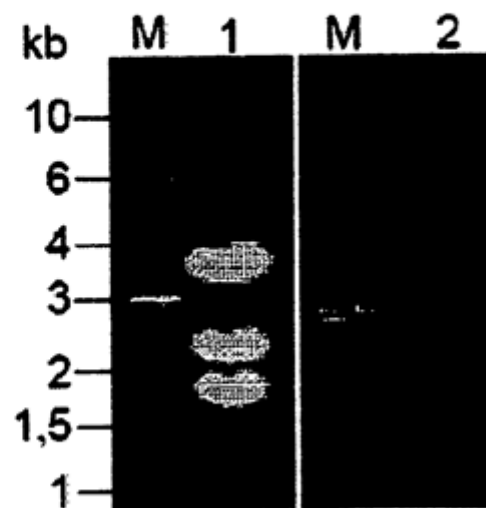
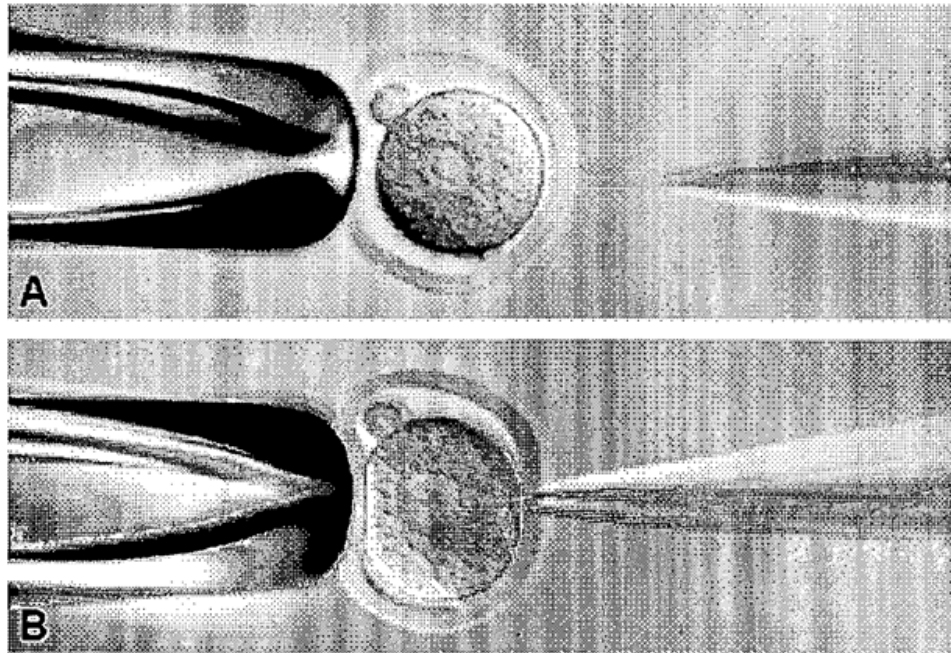


FIGURA 6



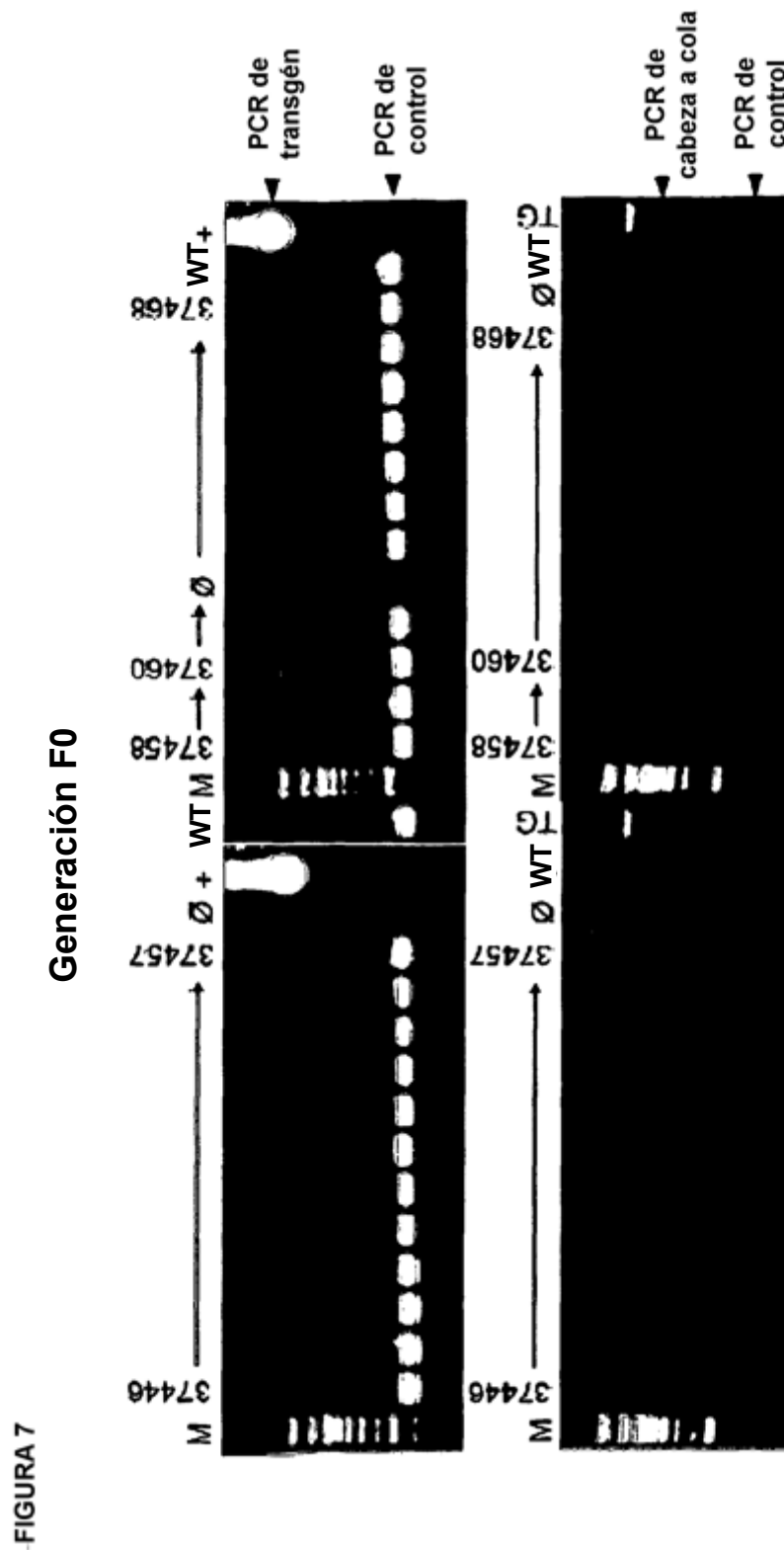


FIGURA 8



FIGURA 9A

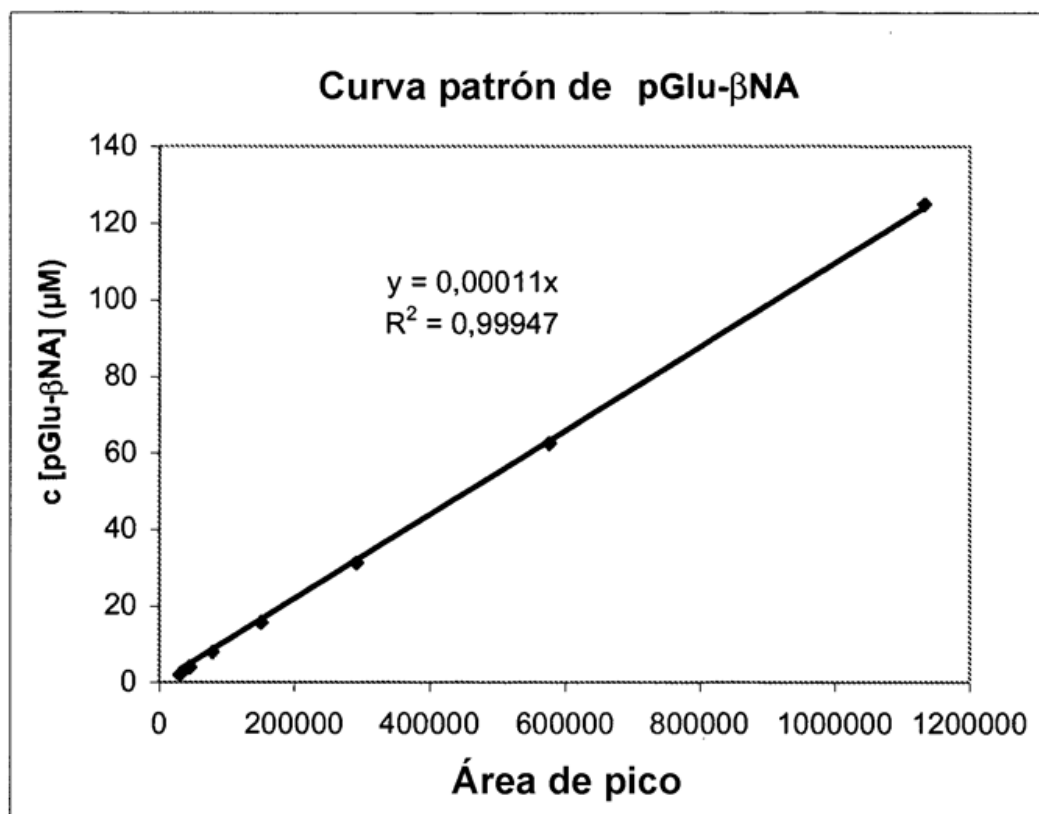


FIGURA 9B

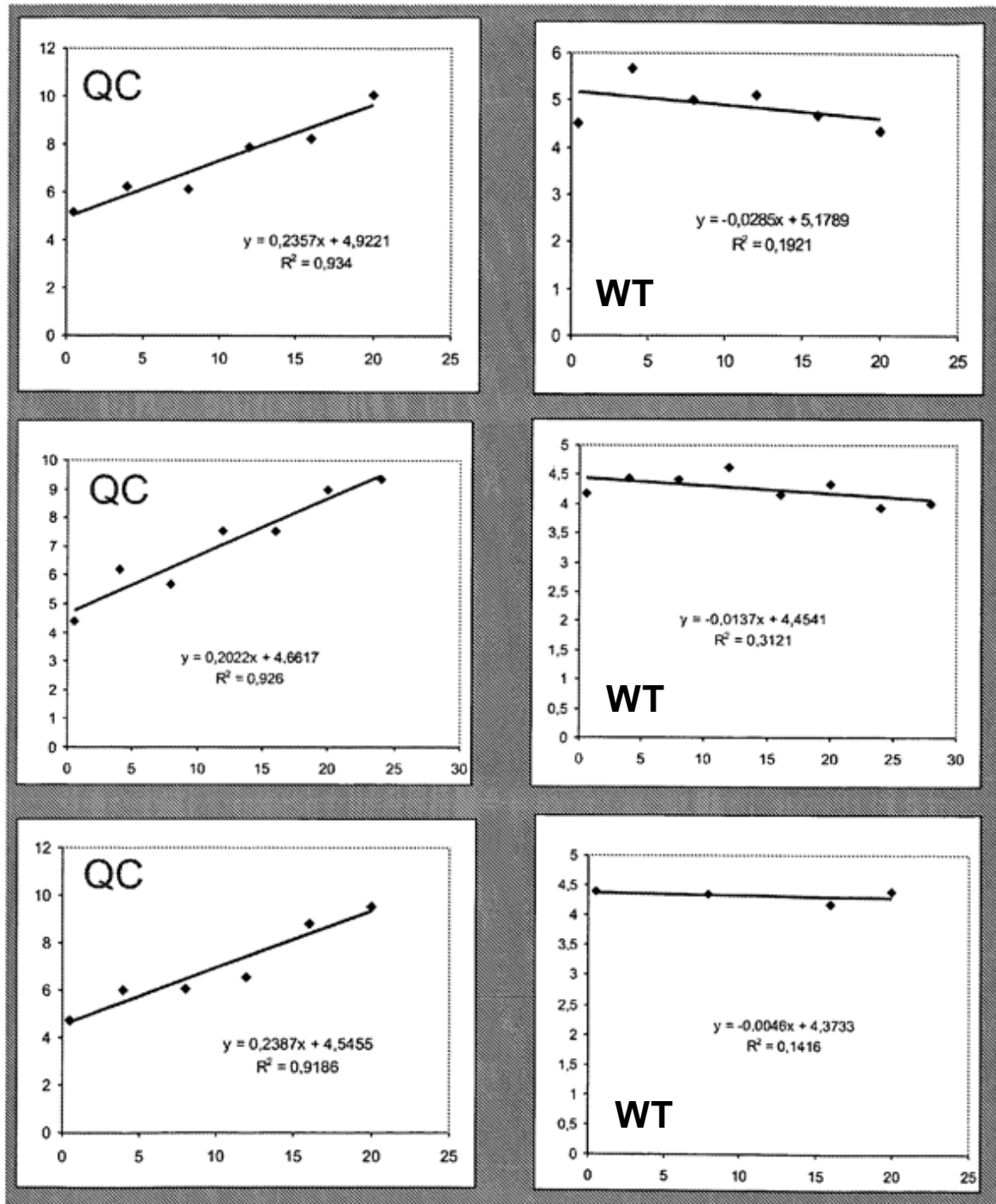
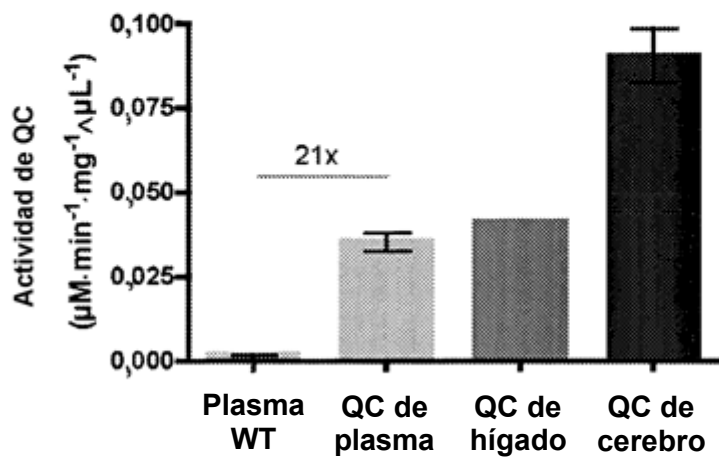


FIGURA 10 A y B

A



B

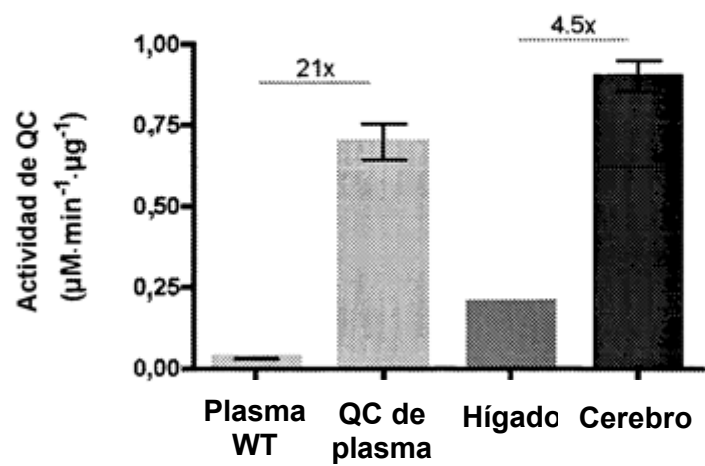
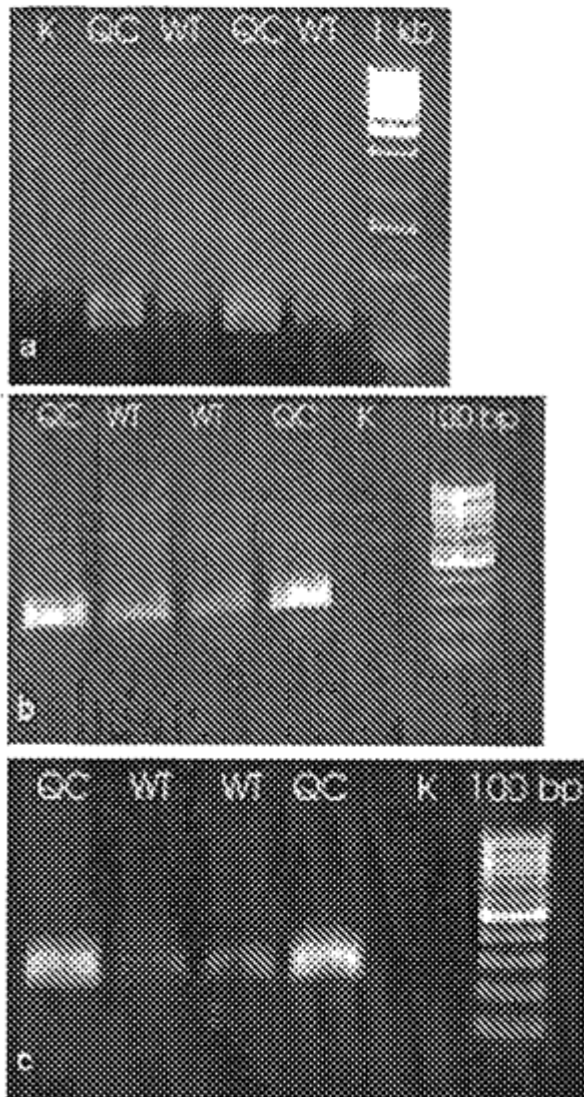


Figura 10C

C



ZX

Figura 10D

D

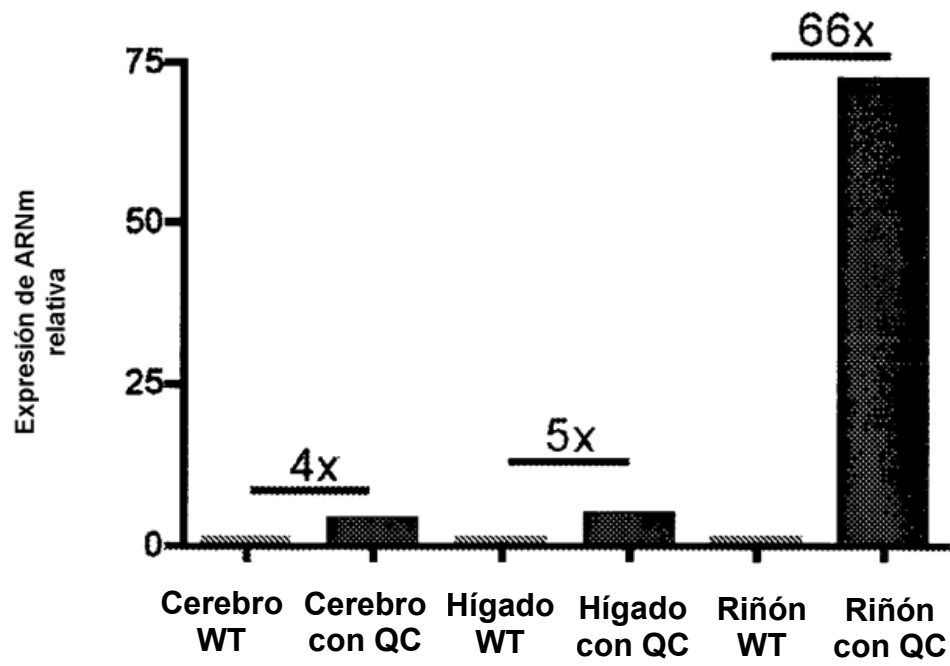


Figura 11

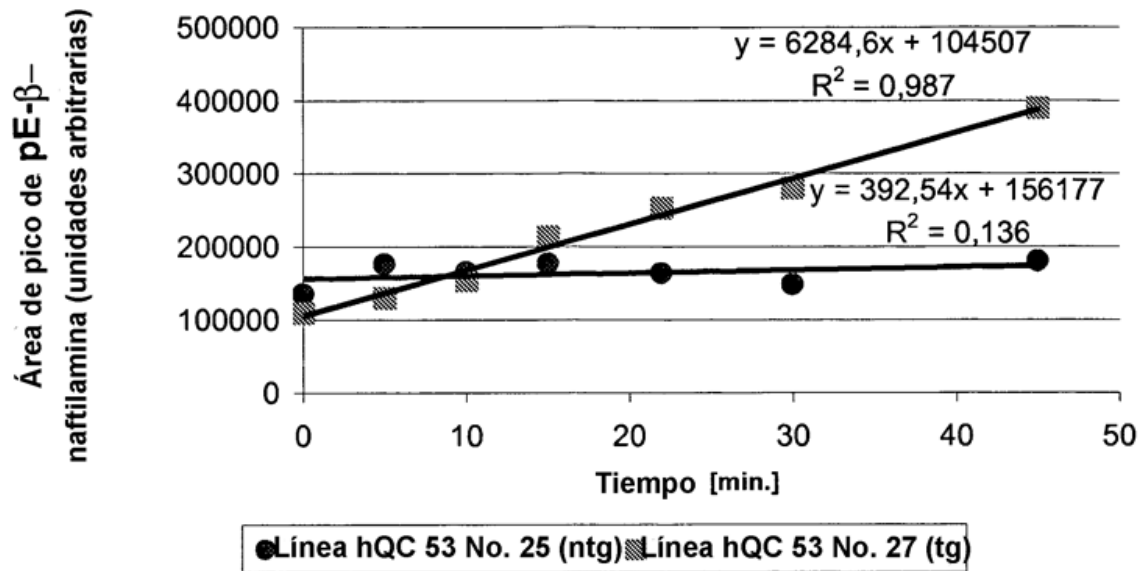


Figura 12

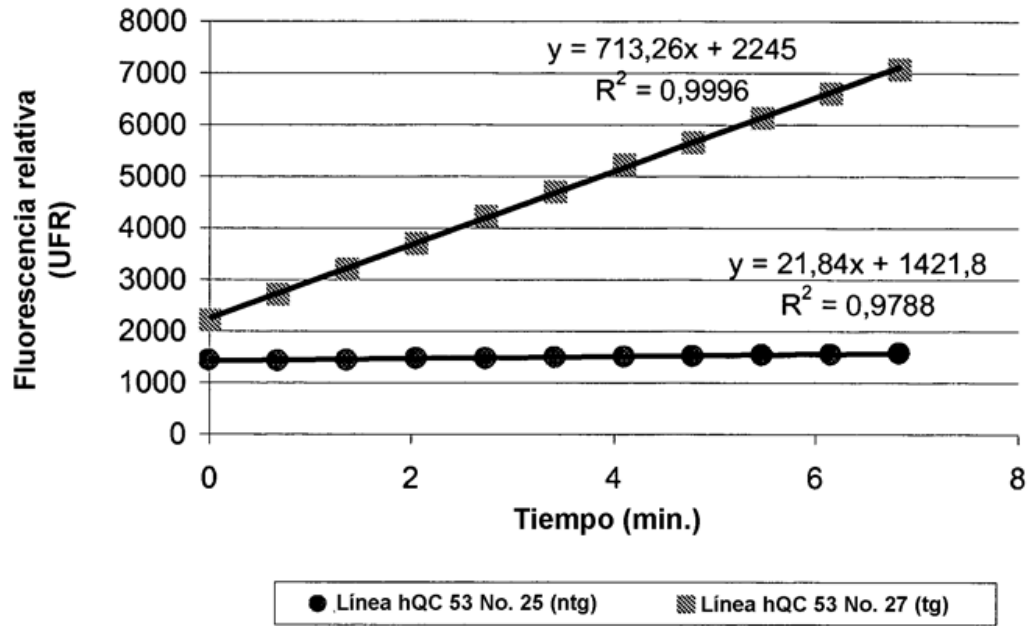


Figura 13A

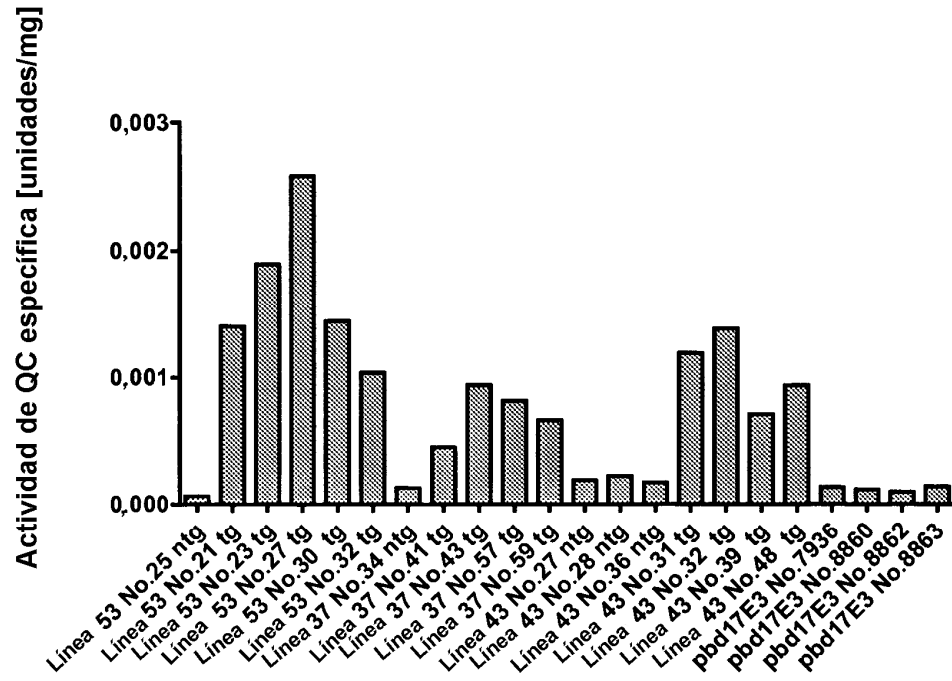


Figura 13B

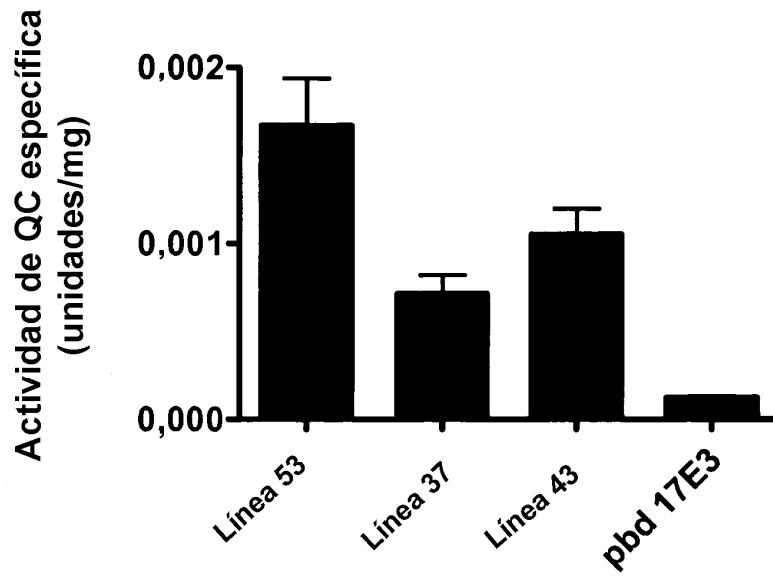


Figura 14

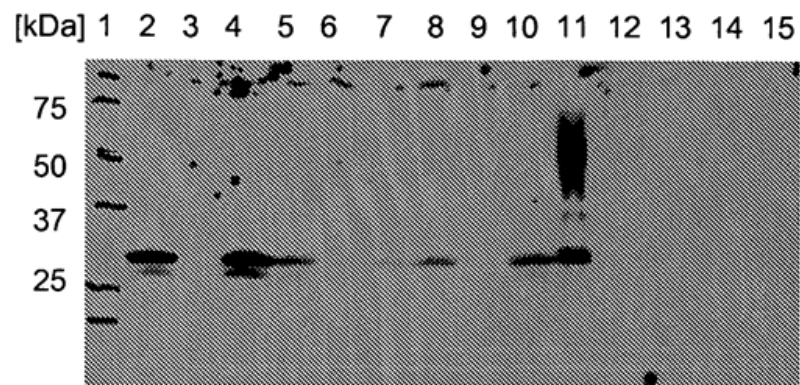


Figura 15

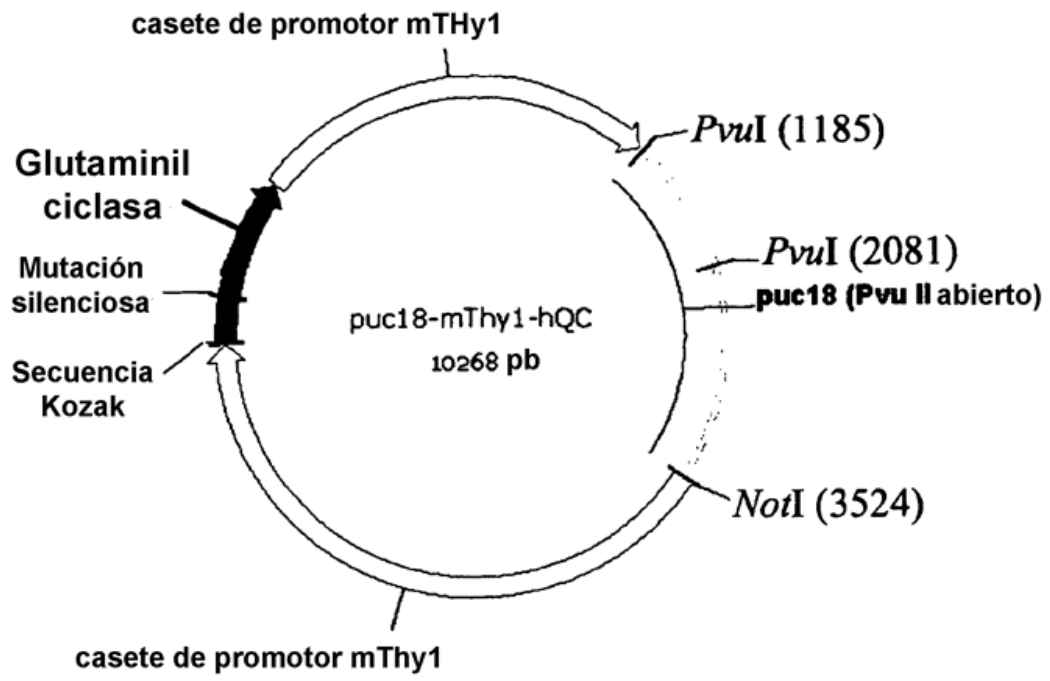


Figura 16

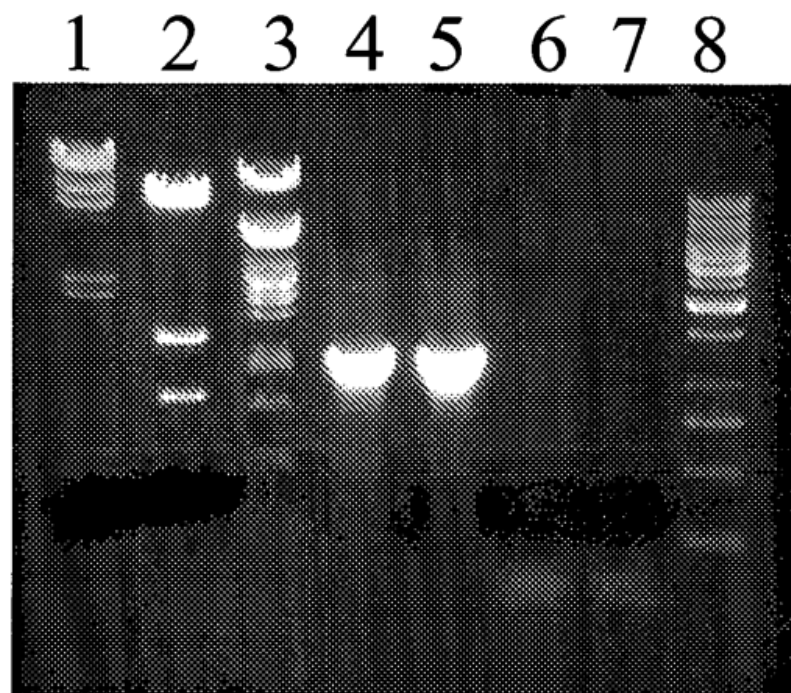


Figura 17

