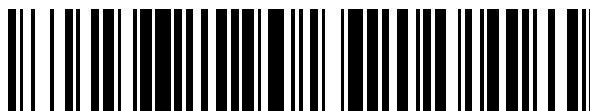


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 712**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04709264 .8**
96 Fecha de presentación: **09.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1594964**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **Oligonucleótidos que inhiben la expresión de la proteína OB-RGRP y procedimiento de detección de compuestos que modifican la interacción entre las proteínas de la familia de OB-RGRP y el receptor de la leptina**

30 Prioridad:
10.02.2003 FR 0301543

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.07.2012

73 Titular/es:
Aventis Pharma S.A.
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) y
Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS)

72 Inventor/es:
JOCKERS, Ralf;
COUTURIER, Cyril y
UHLMANN, Eugen

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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 2 385 712 T3

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos que inhiben la expresión de la proteína OB-RGRP y procedimiento de detección de compuestos que modifican la interacción entre las proteínas de la familia de OB-RGRP y el receptor de la leptina

La presente solicitud tiene por objeto oligonucleótidos que inhiben la expresión de la proteína OB-RGRP

5 La invención se define por las reivindicaciones.

La leptina es una proteína de 16 kDa secretada principalmente por el tejido adiposo y se une a un receptor (OB-R) que pertenece a la familia de los receptores de las citoquinas. Se han identificado cinco isoformas de membrana de este receptor y derivan del corte y empalme alternativo de un mismo gen. Estas isoformas que poseen el mismo dominio extracelular y transmembrana, se caracterizan por dominios intracelulares de tamaños variables (Tartaglia et al. (1995) Cell 83, 1263-1271). También se ha identificado una forma soluble del receptor y proviene de un corte y empalme alternativo o de una escisión proteolítica del dominio extracelular de las formas de membrana. La forma corta del receptor (OB-Rs) que parece implicada en el transporte de la leptina a través de la barrera hemato-encefálica es la isoforma más expresada. La forma larga (OB-RI) sólo se expresa en algunos tejidos como el hipotálamo y parece responsable de la mayor parte de los efectos biológicos de la leptina (Sweeney, G. (2002) Cell Signal 14, 655-663). La leptina y su receptor han sido objeto de una atención particular a causa de su implicación en la regulación del equilibrio energético, del metabolismo y en la respuesta neuroendocrina a la ingesta alimentaria. Recientemente, se ha mostrado que la leptina también está implicada en funciones adicionales importantes como la regulación de la masa ósea, angiogénesis, cicatrización, formación de trombos, maduración sexual, hematopoyesis, regulación de la inmunidad y de la inflamación, desarrollo fetal y cáncer. La administración de leptina en organismos deficientes en leptina como los ratones (ob/ob) y determinados individuos humanos provoca una disminución de la masa de lípido en diversos tejidos como el hígado y el tejido adiposo (Halaas et al. (1995) Science 269, 543-546, Pelleymounter et al. (1995) Science 269, 540-543, Campfield et al. (1995) Science 269, 546-549, Farooqi et al. (1999) N Engl J Med 341, 879-884). Este tratamiento con leptina también mejora la sensibilidad a la insulina y disminuye la masa grasa en el ratón y el ser humano que presentan una lipodistrofia (Shimomura et al. (1999) Nature 401, 73-76, Oral et al. (2002) New England Journal of Medicine 346, 570-578, Petersen et al. (2002) J Clin Invest 109, 1345-1350). Las personas obesas son generalmente resistentes a la leptina. Las razones de esta resistencia todavía se comprenden mal pero se han sugerido varios mecanismos: un defecto en el transporte de la leptina a través de la barrera hemato-encefálica, un defecto en la activación de los OB-R o de la señalización de estos receptores, y la sobreexpresión de reguladores negativos como SOCS3 y PTP-1B Bjorbaek et al. (2000) J Biol Chem 275, 40649-40657, Cheng et al. (2002) Developmental Cell 2, 497-503, Cook y Unger (2002) Developmental Cell 2, 385-387. La comprensión de los mecanismos de la resistencia a la leptina requiere una caracterización más detallada de los mecanismos implicados en la activación de los OB-R.

El OB-R está asociado constitutivamente a la quinasa janus 2 (JAK2). La unión de JAK2 al receptor es crítica para la señalización por los OB-R y se ha propuesto que está implicada en la estabilización de los dímeros de los receptores OB-R. La activación por agonistas provocará un cambio de conformación en la región yuxtamembrana de la cola citoplásmica de los OB-R. JAK2, que está constitutivamente unido al resto box1 en esta región se activa por autofosforilación y fosforila el receptor OB-RI pero no OB-Rs. La fosforilación de OB-RI permite el anclaje de proteínas STAT que se unen al receptor y se activan por fosforilación en tirosina. Las proteínas STAT activadas se dimerizan y translocan en el núcleo para estimular la transcripción de genes mediante el elemento de respuesta de STAT (Tartaglia (1997) J Biol Chem 272, 6093-6096).

Recientemente, se ha descubierto un segundo promotor para el receptor de la leptina. De forma interesante, un segundo transcrito se co-expresa con los mensajeros de los OB-R a partir de este promotor. Este transcrito se ha observado en varias especies como el ratón, la rata, el ser humano, la levadura y *C. elegans* (Bailleul et al. (1997) Nucleic Acids Res 25, 2752-2758). Los experimentos de hibridación *in situ* confirman la co-expresión de los OB-R y del gen asociado en el cerebro de los ratones incluidas las regiones hipotálamicas implicadas en la regulación del peso corporal (Mercer et al., J Neuroendocrinol 2000 Jul;12(7):649-55). La proteína correspondiente está compuesta por 131 aminoácidos y se denomina proteína relacionada con el gen OB-R (OB-RGRP). Esta proteína ha sido objeto de la solicitud de patente WO98/05792.

Por otra parte, la solicitud de patente EP0969091A2 enseña un polipéptido denominado LEPRGRP. Esta solicitud sugiere que la expresión del gen que codifica el polipéptido LEPRGRP endógeno podría ser inhibida por el sesgo de técnicas que bloquean la expresión.

El hecho de que OB-RGRP se exprese en la levadura y nematodo, organismos desprovistos de receptores de la leptina, indica un papel más general para OB-RGRP, apoyado por la delección de esta proteína en la levadura que provoca un defecto en el transporte de proteínas del golgi hacia las vacuolas (Belgareh-Touze et al. (2002) Molecular Biology Of The Cell 13, 1694-1708).

En 2001, un ADNc denominado MY047, se clonó a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro humano (Huang et al. (2001) Biochimica et Biophysica acta. Gene structure and expression 327-331). Esta proteína ha sido objeto además de la solicitud EP 0 969 091. La función de la proteína correspondiente es todavía desconocida. MY047

tiene una homología del 68 % con OB-RGRP lo que sugiere que estas dos proteínas pertenecen a la misma familia. El análisis de las secuencias disponibles del proyecto de secuenciación del genoma humano muestra que no existe ningún otro homólogo.

5 Los solicitantes están vinculados a determinar el papel de la OB-RGRP y sus relaciones con los receptores de la leptina.

Así, han mostrado la especificidad de las interacciones entre la OB-RGRP y el receptor OBRs.

Además han mostrado que era posible modificar específicamente la expresión de los receptores de la leptina en la superficie celular mediante oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la proteína asociada al gen de los receptores de la leptina (OB-RGRP).

10 La presente tiene por lo tanto por objeto oligonucleótidos opcionalmente modificados que comprenden de 8 a 50 nucleótidos que hibridan de manera específica con la secuencia SEQ ID N° 1 e inhiben la expresión de OB-RGRP, caracterizados porque comprenden una secuencia que presenta una identidad de al menos 90% con la secuencia SEQ ID NO:2. Ventajosamente, estos oligonucleótidos favorecen la expresión de los receptores de la leptina en la superficie celular.

15 Preferentemente, estos oligonucleótidos son antisentido.

Según un modo de aplicación ventajoso estos oligonucleótidos se caracterizan porque los nucleótidos están tioesterificados.

Según otro modo de aplicación ventajoso estos oligonucleótidos se caracterizan porque los nucleótidos están 2' O-metilados.

20 Según otro modo de aplicación ventajoso estos oligonucleótidos se caracterizan porque presentan un residuo trietilenglicol en sus extremos 3'.

Aunque la forma más usada de los compuestos antisentido se presenta en la forma de oligonucleótidos antisentido, la presente invención incluye los derivados de oligonucleótidos y los compuestos que mimetizan su estructura tales como los descritos más adelante, sin que esta lista sea limitativa. Los compuestos antisentido según esta invención comprenden preferentemente, de 8 a 50 nucleobases (es decir, son oligómeros formados por 8 a 50 unidades nucleotídicas). Los compuestos antisentido particularmente considerados son los oligonucleótidos antisentido, más especialmente los que están formados por aproximadamente 12 a 30 nucleobases. Los compuestos antisentido comprenden ribozimas, oligozimas y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Un nucleósido es una combinación de una base nitrogenada y un azúcar. La base de un nucleósido es generalmente una base nitrogenada heterocíclica. Los dos tipos de base heterocíclica más comunes son las bases púricas y pirimidínicas. Los nucleótidos son nucleósidos que portan un grupo fosfato unido de manera covalente al azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que contienen una pentanofuranosa, el fosfato puede unirse al hidroxilo en posición 2', 3' ó 5' del azúcar. La formación de nucleótidos proviene de la unión covalente del grupo fosfato de dos nucleósidos adyacentes lo que permite poco a poco la obtención de un oligómero lineal. Los dos extremos de dicho polímero lineal pueden a su vez unirse para formar una estructura circular, pero la estructura abierta se prefiere generalmente. En la estructura nucleotídica, los grupos fosfato se considera que forman el esqueleto internucleosídico del oligonucleótido. La unión normal en el esqueleto de ARN o de ADN es una unión fosfodiéster 3'-5'. Los ejemplos específicos de compuestos antisentido utilizables en esta invención incluyen los oligonucleótidos que contienen un armazón modificado o uniones internucleosídicas no naturales. Así, los oligonucleótidos con armazón modificado comprenden los que conservan un átomo de fosfato en su esqueleto y los que están desprovistos de él. Para las necesidades de la presente invención, los oligonucleótidos modificados que no poseen átomo de fosfato en su unión internucleosídica pueden a pesar de todo considerarse como oligonucleótidos. El armazón de estos oligonucleótidos modificados puede comprender por ejemplo grupos fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos incluidos los 3'-alquilen fosfonatos, 5'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, grupos fosfinatos, fosforamidatos incluidos 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borofosfatos que forman uniones normales, 3'-5', y sus análogos que forman uniones 2'-5', así como los que presentan una polaridad invertida, es decir que comprenden al menos una unión internucleosídica de tipo 3'-3', 5'-5' ó 2'-2'. La forma de oligonucleótidos que poseen una polaridad invertida utilizada preferentemente es la que posee la primera unión internucleosídica en 3' es de tipo 3'-3'. Ésta corresponde a un único residuo nucleosídico invertido, que por otra parte puede ser abásico, es decir en el que la base nitrogenada heterocíclica está ausente o se ha reemplazado por un grupo hidroxilo. Las diversas formas (salinas o ácido libre) se incluyen en el campo de esta invención.

55 El armazón de los oligonucleótidos modificados desprovistos de átomo de fósforo está formado preferentemente por cadenas cortas alquilo o cicloalquilo, incluidos sus derivados que contienen uno o varios heteroátomos, que sirven de unión internucleosídica. Este tipo de armazón puede ser a base de unión morfolino (constituida en parte por el azúcar del nucleósido), de siloxano, de formacetilo y tioformacetilo, de metilen formacetilo y metilen tioformacetilo,

de riboacetilo, de alquenos, de sulfamatos, de sulfonato y sulfonamida, de metilen imina y metilen hidrazina, de amida, y de cualquier otro grupo que contiene diversos átomos de nitrógeno, de azufre y de oxígeno o grupos metilo.

Para otros análogos de oligonucleótidos, el azúcar y la unión internucleosídica (es decir, el armazón) se reemplazan a la vez en la estructura nucleotídica por nuevos grupos. La base nitrogenada heterocíclica se conserva para asegurar la hibridación con el ácido nucleico diana. Dichos compuestos oligómeros, los PNA (por Peptide Nucleic Acid, Ácido Nucleico Peptídico), han mostrado una excelente capacidad de hibridación. En estos compuestos, el esqueleto del oligonucleótido se reemplaza por un armazón a base de amida, en particular por aminoetil glicina, injertada directamente o indirectamente sobre las bases nitrogenadas. Además una amplia información sobre estos PNA pueden encontrarse en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497.

- 5 La invención incorpora más particularmente oligonucleótidos con armazón fosforotioato, amida y morfolina, y oligonucleótidos con esqueleto con heteroátomos, más precisamente:

-CH₂-NH-O-CH₂-

-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (denominado esqueleto metilen-(metilimino) o MMI)

-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-

- 15 -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-

-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (en el que el puente fosfodiéster es: O-P-O-CH₂).

La modificación de los oligonucleótidos puede afectar igualmente a los azúcares: las sustituciones preferidas son en posición 2' (F; derivados O-, N- o S-alcanos, O-, N- o S-alquenos o O-, N- o S-alquinos de longitud C1 a C11, sustituidos o no) en particular, los derivados preferidos son:

- 20 O-[(CH₂)_nO]_m-CH₃

O-(CH₂)_n-O-CH₃

O-(CH₂)_n-NH₂

O-(CH₂)_n-CH₃

O-(CH₂)_n-O-NH₂

- 25 O-(CH₂)_n-O-N[(CH₂)_n-CH₃]₂

en los que n y m varían de 1 a 10.

Otras modificaciones de la posición 2' incluyen los grupos siguientes: cadenas alifáticas sustituidas o no de longitud C1 a C10, arilos, arilos-alquilos y alquilos-arilos; -SH, -SCH₃, -OCN, -Cl, -Br, -CN, -CF₃, -OCF₃, -SO₂CH₃, -ONO₂, -NO₂, -N₃, -NH₂; sililos sustituidos; grupo "informador"; grupo intercalante; grupos de escisión del ARN; grupo para mejorar las capacidades farmacodinámicas de un oligonucleótido. Las modificaciones preferidas incluyen los grupos:

- 30 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, igualmente llamado 2'-O-(2'-metoxietilo) ó 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78f 486-504) 2'-dimetilaminoetoxi (O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, igualmente llamado 2'-DMAOE

2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-O-CH₂OCH₂-N(CH₂)₂, igualmente llamado 2'-dimetilaminoetoxietilo ó 2'-DMAEOE).

- 35 Otra modificación interesante da lugar a la formación de LNA (Locked Nucleic Acids, Ácidos Nucleicos Bloqueados) en los que el hidroxilo en posición 2' está unido al carbono en posición 3' ó 4' del azúcar, formando un azúcar con estructura bicíclica. El puente preferido se hace por un enlace metilo o etilo entre el oxígeno 2' y el carbono en 4'.

Otras sustituciones preferidas en posición 2' incluyen:

-O-CH₃ (2'-metoxi)

-O-(CH₂)₃-NH₂ (2'-aminopropoxi)

- 40 -CH₂-CH=CH₂ (2'-alilo)

-O-CH₂-CH=CH₂ (2'-O-alilo)

-F (2' flúor).

Estas modificaciones en 2' pueden presentarse en posición ribo (abajo) o arabino (arriba). El sustituyente 2' flúor es el preferido en posición arabino.

Pueden hacerse modificaciones similares sobre otras posiciones, en particular en posición 3' del azúcar del nucleótido en el extremo 3'-terminal o en los oligonucleótidos con armazón 2'-5', y en posición 5' del azúcar en el extremo 5'-terminal. Los azúcares de los oligonucleótidos pueden ser reemplazados igualmente por análogos (por ejemplo un ciclobutilo puede sustituirse por un pentofurano).

- 5 Los oligonucleótidos también pueden contener modificaciones o sustituciones a nivel de las nucleobases (bases heterocíclicas nitrogenadas llamadas "bases" por el experto en la técnica). Las bases naturales (no modificadas) son las purinas (adenina A y guanina G) y las pirimidinas (citosina C, timina T y uracilo U). Entre las bases modificadas se incluyen moléculas naturales o sintéticas tales como 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina; 6-metilo, 2-metilo y otros derivados alquilados de las bases púricas (A y G); derivado 2-tio (C, T y U); derivado 5-halo (U, C); derivado 5-propinil (U y C) citosina; derivado 6-azo (U, T y C); 5-uracilo; 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo otras adeninas y guaninas sustituidas en posición 8; 5-halo (en particular 5-bromo), 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidas en posición 5; 7-metilguanina y 7-metiladenina; 2-fluoroadenina; 2-amino-adenina; 8-azaguanina y 8-azaadenina; 7-deazaguanina y 7-deazaadenina; 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. En las demás bases modificadas, se encuentran las pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), fenoxazina citidina sustituidas (como la 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]-indol-2'-ona).

- 20 Las bases modificadas comprenden los compuestos cuyo heterociclo púrico o pirimidínico se ha reemplazado por otro heterociclo por ejemplo 7-deazaadenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina ó 2-piridona (The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859" Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990; Englisch et al., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993). Algunas de estas bases modificadas pueden tener un gran interés para aumentar la afinidad de los compuestos oligoméricos de la invención, como las pirimidinas sustituidas en posición 5, las azapirimidinas, las purinas N- y O- sustituidas (tales como la 2-aminopropiladenina, el 5-propinil uracilo, la 5-propinil citosina). Las 5-metilcitosinas sustituidas tienen un efecto positivo en la estabilidad de los dúplex oligómeros-ácidos nucleicos (Sanghvi Y.S.f Crooke S.T, y Lebleu, B., eds.f Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, p. 276-278) y son la sustitución preferida, en particular en combinación con las modificaciones 2'-metoxietilo de los azúcares.

Preferentemente, estos oligonucleótidos están en la forma monocatenaria.

- 30 Según un modo de aplicación particularmente ventajoso estos oligonucleótidos comprenden una secuencia que presenta una identidad de al menos 90 %, con la secuencia SEQ ID N°2, en la que los nucleótidos en posiciones 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 20, en el sentido 5' hacia 3', están tioesterificados.

- 35 Según un modo de aplicación particularmente ventajoso estos oligonucleótidos comprenden una secuencia que presenta una identidad de al menos 90 %, con la secuencia SEQ ID N°2, en la que los nucleótidos en posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 y/o 20, en el sentido 5' hacia 3', están 2' O-metilados.

Preferentemente, los oligonucleótidos según la presente invención son ADN.

- 40 La presente invención tiene también por objeto los oligonucleótidos de tipo ARNi (Ácido Ribonucleico de Interferencia) que comprenden de 15 a 60 nucleótidos, caracterizados porque hibridan de manera específica con la secuencia SEQ ID N° 21 e inhiben la expresión de OB-RGRP, y caracterizados porque son ARN bicatenarios en los que al menos una de las dos cadenas comprende una secuencia que presenta una identidad de al menos 90 %, con una de las secuencias SEQ ID N°37 o SEQ ID N°38.

- 45 La presente invención tiene igualmente por objeto los oligonucleótidos de tipo ARNi que comprenden de 15 a 60 nucleótidos que hibridan de manera específica con la secuencia SEQ ID NO: 21 e inhiben la expresión de OB-RGRP, caracterizados porque están en forma monocatenaria y porque comprenden una secuencia que presenta una identidad de al menos 90%, con la secuencia SEQ ID N°42.

Preferentemente, dichos ARNi comprenden 17 ó 19 nucleótidos tomados en continuo en la secuencia SEQ ID NO : 21, o en su secuencia complementaria.

- 50 Los nucleótidos A(A/G) y (C/T)T pueden añadirse respectivamente en 5' y en 3' de esta secuencia de 17 ó 19 nucleótidos. Otros tipos de residuos o grupos químicos pueden añadirse si embargo a estos dos extremos, sin que disminuyan la actividad de los antisentido.

Las modificaciones de nucleótidos descritas para los antisentidos son también posibles para los que forman parte de la composición de los sARNi.

- 55 La presente invención incluye igualmente todas las modificaciones de los antisentidos o de los ARNi, que pretendan aumentar la resistencia de estos compuestos a las nucleasas celulares, o su penetración en las células y/o su eficacia en el direccionamiento hacia la secuencia de OB-RGRP.

Cuando son ADN, los oligonucleótidos según la presente invención pueden realizarse cómodamente y rutinariamente por la técnica muy conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis se comercializa por diferentes empresas especializadas tales como Applied Biosystems (Foster City, CA). La síntesis de los antisentido en la presente invención recurre a una síntesis química sobre un soporte adaptado según los métodos conocidos por el experto en la técnica, en particular descritos por E. Uhlmann, A. Peyman, A. Rytte, A. Schmidt y E. Buddecke (1999, *Methods in Enzymology* 313: 268-284) y por E. Uhlmann (*Recent advances in the medicinal chemistry of antisense oligonucleotides*, *Current Opinion of Drug Discovery and Development* 3: 203-213, 2000). También puede emplearse cualquier otro procedimiento de síntesis conocido por el experto en la técnica.

Cuando son ARNi los oligonucleótidos según la presente invención pueden sintetizarse por síntesis química, cuando se trata de de ARNi sintéticos, expresados in situ mediante vectores que permiten la síntesis de dichos oligonucleótidos u obtenidos por escisión de un ARN bicatenario por la RNase III o la enzima DICER.

Los ARNi (ARNi small o ARNi pequeños) pueden obtenerse a través de diferentes suministradores como Proligo (Proligo France SAS 1 rue Robert et Sonia Delaunay 75011 París) Dharmacon (Dharmacon, Inc. 1376 Miners Drive #101 Lafayette, CO 80026) y Ambion (Ambion (Europe) Ltd. Ermine Business Park Spitfire Close Huntingdon, Cambridgeshire PE29 6XY Reino Unido), o pueden sintetizarse a partir de kits comercializados por diferentes empresas como Dharmacon y Ambion.

Preferentemente, los ARNi según la presente invención están en forma bicatenaria.

Después de la síntesis los ARNi se recogen en primer lugar en agua desprovista de ARNasas. El emparejamiento de las dos moléculas monocatenarias puede realizarse como sigue: 20 μ moles.L-1 de cada cadena se mezcla en el tampón de emparejamiento (100 mmoles.L-1 de acetato de potasio, 30 mmoles.L-1 de HEPES-KOH pH 7,4, 2 mmoles.L-1 de acetato de magnesio) y se calienta a 90°C durante 1 min seguido de una incubación de 1 h a 37°C.

La transfección de los ARNi puede hacerse por el mismo protocolo que para la transfección de los antisentido.

Una alternativa para el ARNi es la utilización de vectores que permiten la síntesis de ARN antisentido específicos del gen a inactivar y que se va a emparejar en las células transfectadas para proporcionar un ARNi. Un primer sistema de vector permite la expresión de una secuencia antisentido por dos promotores en sentido inverso, a cada lado de esta secuencia, proporcionando la aparición de dos ARN complementarios que van a emparejar en las células transfectadas y proporcionar un ARNi. Otro sistema de vector emplea la síntesis de un ARN que presenta la secuencia del antisentido seguida de la secuencia con sentido, espaciada por algunos nucleótidos, que va a crear una estructura de ARN en horquilla, que va a escindirse en las células transfectadas para proporcionar un ARNi. Otro sistema más de vector emplea la expresión de un ARN bicatenario, con una longitud de hasta 600 pares de bases que no puede salir del núcleo por falta de las secuencias necesarias: sin caperuza en 3' (sitio ribozima), ni cola poli-A en 5' (sitio de fijación de la proteína con dedo de cinc MAZ). Este ARN largo se escinde en el núcleo para proporcionar ARNi funcionales que van a salir al citoplasma y provocar la degradación del ARN diana.

La transfección de estos vectores se efectúa de manera clásica como se ha descrito anteriormente para los diferentes ADN. La obtención de líneas estables que presentan una extinción del gen diana se puede realizar por una selección con antibiótico utilizada clásicamente para la obtención de líneas.

De manera general, el experto en la técnica puede referirse para los ARNi a las publicaciones siguientes: Elbashir S.M. et al. (2001, *Nature* 411: 494-498), Elbashir S.M. Lendeckel W. y Tuschl T. (2001, *Genes & Dev.* 15:188-200) et Masters J.R., et al. (2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8012-8017).

Los vectores que permiten la expresión de los ARNi pueden obtenerse como describen Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. (2002, *Science* 296: 550-553), Yu J.Y., DeRuiter S.L., y Turner D. (2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6047-6052) y Shinagawa T. y Ishii S. (2003, *Genes & Dev.* 17:1340-1345).

Dichos vectores, así como las células que contienen dichos vectores son objetos de la presente solicitud.

Por otra parte, la presente invención divulga medicamentos que contienen dichos oligonucleótidos, vectores y células y composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad farmacológicamente activa de dichos oligonucleótidos, vectores y células y excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención divulga igualmente la utilización de dichos oligonucleótidos, vectores y células para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de patologías ligadas a la leptina.

Divulga además un procedimiento de tratamiento curativo o preventivo de enfermedades ligadas a la leptina que consiste en administrar dichos oligonucleótidos, vectores y células a un paciente que padece dicha enfermedad.

La invención divulga igualmente un procedimiento de determinación de la modificación de la interacción entre la OB-RGRP o la proteína MYO47, o una proteína que presenta una identidad de al menos 65 % con esta proteína o con la proteína MYO47, y el receptor de la leptina por un compuesto.

Divulga además proteínas de fusión para la aplicación de este procedimiento, así como ácidos nucleicos que codifican estas proteínas.

Divulga además un procedimiento de tratamiento curativo o preventivo de enfermedades ligadas a la leptina que consiste en administrar un ligando seleccionado por el procedimiento definido anteriormente a un paciente que padece dicha enfermedad.

Se divulga igualmente una proteína de fusión caracterizada porque está compuesta por una secuencia que presenta una identidad de al menos 65 % con la secuencia SEQ ID N°4, o la secuencia SEQ ID N°16, o una parte sustancial de la secuencia SEQ ID N°4 o de la secuencia SEQ ID N°16, y por una proteína donadora de energía o aceptora de energía, o por una parte sustancial y activa de una proteína donadora de energía o aceptora de energía.

Dichas proteínas de fusión están compuestas en sustancia por una parte correspondiente a una parte o la totalidad de una secuencia que presenta una identidad de al menos 65% preferentemente de al menos 75% y aún más preferentemente de al menos 85% ó 95%, con secuencia SEQ ID N°4, o la secuencia SEQ ID N°16, o una parte sustancial de la secuencia SEQ ID N°4 o de la secuencia SEQ ID N°16, y por una parte correspondiente a una proteína donadora o aceptora de energía. Pueden sin embargo comprender otras secuencias de aminoácidos, obtenidas de otras proteínas, tales como secuencias señal.

De manera ventajosa, la proteína donadora de energía es la luciferasa de Renilla (Rluc). Puede sin embargo ser cualquier otra proteína donadora de energía tal que el espectro de emisión del donador se solape suficientemente con el espectro de excitación del aceptor para permitir una transferencia de energía eficaz entre los dos compañeros. Puede ser así la GFP, si la transferencia de energía es el FRET, o también la aequorina si la transferencia de energía es el CRET. La aequorina puede obtenerse y utilizarse como se describe en la solicitud de patente EP0 187 519, o en el artículo de Inouye et al. (PNAS USA 82 : 3154-3158 (1985)).

La proteína fluorescente aceptora de energía es en cuanto a ella preferentemente la DsRed, la GFP o un mutante de esta proteína, tal como YFP, EYFP, GFP salvaje, GFPS65T, Topaz, o GFP₁₀.

Puede sin embargo ser cualquier otra proteína fluorescente aceptora de energía tal que el espectro de excitación del aceptor y el espectro de emisión del donador se solapen suficientemente para permitir una transferencia de energía eficaz entre los dos compañeros.

Estas proteínas son conocidas por el experto en la técnica que puede encontrar sus secuencias en la bibliografía, principalmente en la revisión de Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)). En particular la GFP se describe por Tsien (Annu. Rev. Biochem. 67 : 509-544 (1998)) y su clonación por Prasher et al. (Gene 111 : 229-233 (1992)). La clonación de la DsRed se describe en cuanto a ella por Matz et al. (Nat. Biotechnol. 17: 969-973 (1999)). Para Rluc, el experto en la técnica puede referirse a Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)) o también a Lorenz et al. (PNAS 88: 4438-4442 (1991)).

De manera particularmente ventajosa, las proteínas de fusión donadora y aceptora presentan una de las secuencias SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°12, SEQ ID N°14, SEQID N°18 o SEQID N°20 o una variante de esta secuencia que presenta una identidad de al menos 65%.

La presente invención divulga también ácidos nucleicos que codifican estas proteínas. Dichos ácidos nucleicos pueden ser ADN complementarios o genómicos, o ARN. Estos ácidos nucleicos o polinucleótidos pueden estar en forma monocatenaria o en la forma de dúplex.

Son de manera particularmente ventajosa ADN complementarios. De manera preferente, dicho ácido nucleico tiene una identidad de al menos 65 %, preferentemente de al menos 75 %, y aún más preferentemente de al menos 85 % ó 95 %, de identidad de nucleótidos con un ácido nucleico de secuencia SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°17 o SEQ ID N°19.

La invención también divulga un ácido nucleico que hibrida, en condiciones de hibridación de alta astringencia, con un ácido nucleico tal como se ha definido anteriormente, y más particularmente un ácido nucleico de secuencias nucleotídicas SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°17 o SEQ ID N°19, o un ácido nucleico de secuencia complementaria.

El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos, en el sentido de la presente invención, se puede determinar comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a través de una ventana de comparación.

La parte de la secuencia nucleotídica o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender por lo tanto adiciones o deleciones (por ejemplo "huecos") respecto a la secuencia de referencia (que no comprende estas adiciones ni estas deleciones) de forma que se obtenga un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que una base nucleica o un residuo de aminoácido idéntico se observa para las dos secuencias (nucleica o peptídica) comparadas, dividiendo después el

número de posiciones en las que hay identidad entre las dos bases o residuos de aminoácidos por el número total de posiciones en la ventana de comparación y a continuación multiplicando el resultado por 100 con el fin de obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede realizar de forma informática mediante algoritmos conocidos contenidos en el paquete informático de la Empresa WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN. A título de ilustración, el porcentaje de identidad de secuencia podrá efectuarse mediante el programa informático BLAST (versiones BLAST 1.4.9 de marzo 1996, BLAST 2.0.4 de febrero 1998 y BLAST 2.0.6 de septiembre 1998), utilizando exclusivamente los parámetros por defecto (S. F Altschul et al, J. Mol. Biol. 1990 215 : 403-410, S. F Altschul et al, Nucleic Acids Res. 1997 25 : 3389-3402). Blast busca las secuencias similares/homólogas a una secuencia « requerida » de referencia, mediante el algoritmo de Altschul et al. La secuencia requerida y las bases de datos utilizadas pueden ser peptídicas o nucleicas, siendo posible cualquier combinación.

Por "condiciones de hibridación de alta astringencia" en el sentido de la presente invención, se entenderán las condiciones siguientes:

1- Competición de membranas y PRE HIBRIDACIÓN:

- Mezclar: 40 µl de ADN de esperma de salmón (10mg/ml) + 40 µl de ADN de placenta humana (10mg/ml)
- Desnaturalizar 5 min a 96°C y sumergir la mezcla en hielo.
- Extraer el SSC 2X y verter 4 ml de mezcla de formamida en el tubo de hibridación que contiene las membranas.
- Añadir la mezcla de los dos ADNs desnaturalizados.
- Incubación a 42°C durante 5 a 6 horas, con rotación.

2- Competición de la sonda marcada:

- Añadir a la sonda marcada y purificada de 10 a 50 µl de ADN Cot I, según la cantidad de repeticiones.
- Desnaturalizar 7 a 10 mn a 95°C.
- Incubar a 65°C durante 2 a 5 horas.

3- Hibridación:

- Extraer la mezcla de pre-hibridación.
- Mezclar 40 µl de ADN de esperma de salmón + 40 µl de ADN de placenta humana; desnaturalizar 5 mn a 96°C y sumergir en hielo.
- Añadir en el tubo de hibridación 4 ml de mezcla de formamida, la mezcla de los dos ADN y la sonda marcada/ADN Cot I desnaturalizado.
- Incubar de 15 a 20 horas a 42°C, con rotación.

4- Lavados:

- Un lavado a temperatura ambiente en SSC 2X, para aclarar.
- 2 veces 5 minutos a temperatura ambiente SSC 2X y SDS 0,1% a 65°C.
- 2 veces 15 minutos a 65°C SSC 1X y SDS 0,1% a 65°C.

Cubrir las membranas con Saran y exponer.

Las condiciones de hibridación descritas anteriormente están adaptadas a la hibridación en condiciones de alta astringencia de una molécula de ácido nucleico de una longitud variable de 20 nucleótidos a varios cientos de nucleótidos.

No hace falta decir que las condiciones de hibridación descritas anteriormente pueden adaptarse en función de la longitud del ácido nucleico cuya hibridación se pretende realizar o del tipo de marcaje elegido, según las técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Las condiciones convenientes de hibridación pueden adaptarse por ejemplo según la enseñanza contenida en el trabajo de HAMES y HIGGINS (1985, "Nucleic acid hybridization ; a practical approach", Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford) o también en el trabajo de F.AUSUBEL et al (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

- 5 Las proteínas divulgadas en la presente invención pueden obtenerse por cualquier medio conocido por el experto en la técnica. Sin embargo, se obtienen ventajosamente por expresión de los ácidos nucleicos tales como los descritos anteriormente, que codifican estas proteínas, opcionalmente insertados en vectores de expresión, en células elegidas ventajosamente, seguido opcionalmente de una extracción y una purificación que puede ser total o parcial.

La invención divulga igualmente un vector recombinante que comprende un ácido nucleico descrito anteriormente.

- 10 Ventajosamente, dicho vector recombinante comprenderá un ácido nucleico elegido entre los ácidos nucleicos siguientes:

a) un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene al menos 65 % de identidad en aminoácidos con una secuencia SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°18 o SEQ ID N°20 o un fragmento peptídico o una variante de esta última;

- 15 b) un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°17 o SEQ ID N°19, o un fragmento o una variante de esta última;

c) un ácido que tiene al menos 65 % de identidad en nucleótidos con un ácido nucleico que tiene una secuencia SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°17 o SEQ ID N°19 o un fragmento o una variante de este último;

- 20 d) un ácido nucleico que hibrida, en condiciones de hibridación de alta astringencia, con un ácido nucleico de secuencias SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°17 o SEQ ID N°19 o un fragmento o una variante de este último.

Por « vector » en el sentido de la presente invención se entenderá una molécula de ADN o de ARN circular o lineal que está indistintamente en forma monocatenaria o bicatenaria.

El vector de expresión puede comprender además de un ácido nucleico según la invención, secuencias reguladoras que permiten dirigir la transcripción y/o la traducción.

- 25 Dicho vector recombinante comprenderá principalmente los elementos siguientes:

(1) elementos de regulación de la expresión del ácido nucleico a insertar, tales como promotores y amplificadores;

(2) la secuencia codificadora comprendida en el ácido nucleico según la invención a insertar en dicho vector, estando situada dicha secuencia codificadora en fase con las señales de regulación descritas en (1) ; y

(3) secuencias de inicio y de parada de la transcripción apropiadas.

- 30 Además, los vectores recombinantes podrán incluir uno o varios orígenes de replicación en los huéspedes celulares en los que se busca su amplificación o su expresión, marcadores o marcadores de selección.

A título de ejemplos, los promotores para células eucariotas comprenderán el promotor de la timidina quinasa del virus HSV o también el promotor de la metalotioneína-L de ratón.

- 35 De manera general, para la elección de un promotor adaptado, el experto en la técnica podrá referirse ventajosamente al trabajo de SAMBROOK et al. (1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.) o también a las técnicas descritas por FULLER et al. (1996, Immunology in Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al).

Los vectores preferidos son los plásmidos, tales como por ejemplo los vectores pcDNA3 (Invitrogen), pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stragene).

- 40 Puede tratarse igualmente de vectores de tipo *baculovirus* tal como el vector pVL1392/1393 (Pharmingen) utilizado para transfectar las células de la línea Sf9 (ATCC N°CRL 1711) derivadas de *Spodoptera frugiperda*.

También puede tratarse de vectores adenovirales tales como el adenovirus humano de tipo 2 ó 5.

- 45 Un vector recombinante puede ser también un vector retroviral o también un vector adeno-asociado (AAV). Dichos vectores adeno-asociados se describen por ejemplo por FLOTTE et al. (1992, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7 : 349-356).

La presente invención divulga además células que comprenden una proteína, un ácido nucleico o un vector tales como se han descrito anteriormente o fragmentos de estas células, lisados de estas células o también membranas de estas células.

Dichas células pueden ser células aisladas de un organismo y cultivadas en un medio de crecimiento adecuado. Sin embargo, son preferentemente líneas celulares. Así, dichas líneas son de manera particularmente ventajosa las líneas celulares HEK 293, COS (ATCC N°CRL 1650), COS-M6 y HeLa (ATCC N°CCL2), o también Cv 1 (ATCC N°CCL70), Sf-9 (ATCC N°CRL 1711), CHO (ATCC N°CCL-61) o 3T3 (ATCC N°CRL-6361).

5 Las membranas de estas células pueden prepararse por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

Preferentemente, se prepararán por trituración mecánica de las células y centrifugación de las suspensiones obtenidas, como se ilustra en los ejemplos siguientes.

La presente invención divulga además composiciones que comprenden células tales como las descritas anteriormente y saponina.

10 La presente invención divulga además un procedimiento de determinación de la modificación de la interacción entre la OB-RGRP, la proteína MY047, o una proteína que presenta una identidad de al menos 65 % con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina por un compuesto que comprende las etapas que consisten en:

15 – poner en contacto dicho compuesto con una proteína que presenta una identidad de al menos 65 % con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina, o células, o fragmentos, o lisados, o membranas de células que comprenden dichas proteínas, y opcionalmente un sustrato enzimático adecuado, y

– medir la interacción entre una proteína que presenta una identidad de al menos 65% con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina.

20 De manera preferente, dicho compuesto se pone en contacto con una proteína de fusión donadora de energía, y una proteína de fusión aceptora de energía, o células, o fragmentos, o lisados, o membranas de células que comprenden dicha proteína, y opcionalmente un sustrato enzimático adecuado

Preferentemente, dicho procedimiento se aplica con células tratadas con un agente que permeabiliza las células tal como la saponina.

25 Las proteínas de fusión donadoras de energía y las proteínas de fusión aceptoras de energía se eligen de manera que la energía resultante de la activación del donador pueda transferirse de manera eficaz al aceptor.

En un modo de aplicación ventajoso de dicho procedimiento, la proteína de fusión donadora de energía es una proteína de fusión con la luciferasa o una parte sustancial de la luciferasa, en cuyo caso el sustrato es ventajosamente la coelenterazina.

30 En un modo de aplicación preferente de dicho procedimiento, la proteína de fusión aceptora de energía es una proteína de fusión con la YFP o una parte sustancial de la YFP.

En un modo de aplicación ventajoso de dicho procedimiento, la transferencia de energía medida en presencia del compuesto a ensayar se compara con la medida en ausencia del compuesto a ensayar.

35 En otro modo de aplicación ventajoso de dicho procedimiento, la transferencia de energía medida en presencia del compuesto a ensayar y de la leptina (o un ligando del receptor), se compara con la medida en presencia del compuesto en ausencia de leptina (o un ligando del receptor).

Preferentemente, el procedimiento se aplica sobre membranas de células, tales como las descritas anteriormente.

40 De manera preferente, las proteínas donadora y aceptora descritas anteriormente se eligen con el fin de que la transferencia de energía se haga por BRET (para Bioluminescence Résonance Energy Transfer o transferencia de energía de bioluminiscencia por resonancia) de primera o segunda generación, o LRET (para Luminescence Resonance Energy Transfer o transferencia de energía de luminiscencia por resonancia). Sin embargo, dicha transferencia de energía puede efectuarse por FRET (para Fluorescence Résonance Energy Transfer o transferencia de energía de fluorescencia por resonancia) o también por CRET (para Chemiluminescence Resonance Energy Transfer o transferencia de energía de quimioluminiscencia por resonancia).

45 Cualquiera que sea el tipo de transferencia de energía las parejas de proteína de fusión donadora/proteína de fusión aceptora de energía se eligen con el fin de permitir dicha transferencia.

El BRET2 (2a generación) consiste en una transferencia de energía entre la luciferasa de *Rénilla*, y una GFP mutante, la GFP₁₀, utilizando un sustrato adecuado, la coelenterazina DeepblueC™ (Biosignal Packard).

El CRET consiste en una transferencia de energía entre la aequorina, que es una luciferasa, y la GFP.

50 El FRET consiste en una transferencia de energía entre dos proteínas de la familia de las GFP que tienen espectros diferentes.

Para la aplicación de estas transferencias el experto en la técnica puede referirse a Ramsay D et al. (Biochem J 365: 429-40 (2002)) y a Yoshioka K et al. (FEBS Lett 523: 147-151 (2002)) para BRET2, a Baubet et al. (PNAS USA 97 : 7260-7265 (2000)) para CRET, a Matyus (J Photochem Photobiol B 12: 323-337 (1992)) y Pollok y Heim (Trends Cell Biol 9:57-60 (1999)) para FRET.

5 La presente invención también divulga un procedimiento de cribado o de detección de compuestos destinados a la prevención y/o al tratamiento de patologías ligadas a la leptina que comprende las etapas que consisten en:

– poner en contacto dicho compuesto con una proteína que presenta una identidad de al menos 65 % con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina, o células, o fragmentos, o lisados, o membranas de células que comprenden dichas proteínas, y opcionalmente un sustrato enzimático adecuado, y

10 – medir la interacción entre una proteína que presenta una identidad de al menos 65% con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina.

Preferentemente, la proteína que presenta una identidad de al menos 65 con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16 es la OB-RGRP o MY047.

15 Este procedimiento es compatible con las placas de 96 ó 384 pocillos utilizadas generalmente. No necesita la utilización de moléculas radiactivas, es sensible, reproducible, rápido y el resultado se lee fácilmente. Esta característica es particularmente interesante para la aplicación de cribado a gran escala.

La presente invención divulga además la utilización de compuestos seleccionados por un procedimiento que consiste en:

20 – poner en contacto dicho compuesto con una proteína que presenta una identidad de al menos 65 % con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina, o células, o fragmentos, o lisados, o membranas de células que comprenden dichas proteínas, y opcionalmente un sustrato enzimático adecuado, y

– medir la interacción entre una proteína que presenta una identidad de al menos 65% con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina.

25 Divulga finalmente un procedimiento de tratamiento curativo o preventivo de enfermedades ligadas a la leptina o a su receptor que comprende las etapas de :

– selección de dicho compuesto por un procedimiento que consiste en:

+poner en contacto dicho compuesto con una proteína que presenta una identidad de al menos 65 % con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina, o células, o fragmentos, o lisados, o membranas de células que comprenden dichas proteínas, y opcionalmente un sustrato enzimático adecuado, y

30 +medir la interacción entre una proteína que presenta una identidad de al menos 65% con la secuencia SEQ ID N°4 o la secuencia SEQ ID N°16, y el receptor de la leptina.

– administración de dicho compuesto a un paciente que padece dicha enfermedad.

Las patologías ligadas a la leptina pueden ser enfermedades ligadas a una disminución de la densidad ósea como por ejemplo la osteoporosis o a la inversa las ligadas a una calcificación importante.

35 También pueden ser enfermedades que tienen un efecto sobre el peso, tales como obesidad, diabetes o anorexia.

También pueden ser enfermedades que tienen un efecto sobre la maduración sexual, hematopoyesis, angiogénesis, formación de trombos, regulación de la inmunidad y de la inflamación, desarrollo fetal, cicatrización y cáncer.

40 Los compuestos de la invención, oligonucleótidos y ARNi, se pueden formular en las composiciones farmacéuticas con vistas a una administración por vía tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular etc. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos farmacéuticamente aceptables para una formulación inyectable. Puede tratarse en particular de disoluciones salinas (fosfato monosódico, disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, etc, o mezclas de dichas sales), estériles, isotónicas o composiciones secas, principalmente liofilizadas, que, por adición según el caso de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de solutos inyectables.

45 La formulación de composiciones terapéuticas y su administración está en las competencias del experto en la técnica.

50 La formulación de los compuestos puede incluir diferentes productos conocidos por el experto en la técnica. Preferentemente, a los compuestos se pueden añadir por ejemplo sales, como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico o nítrico. Otras sales son igualmente utilizables, como las que provienen del ácido acético, oxálico, tartárico, succínico, maleico, fumárico, glucónico, cítrico, málico,

ascórbico, benzoico, tánico, palmítico, algínico, poliglutámico, naftalenosulfónico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico, naftalenodisulfónico, poligalacturónico. Finalmente, también se pueden utilizar preferentemente sales de cloro, bromo y yodo.

5 La composición y la formulación para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos.

La composición y la formulación para la administración oral pueden incluir polvos, gránulos, micropartículas, nano partículas, suspensiones, disoluciones acuosas o no, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o mini comprimidos. Pueden añadirse espesantes, aromas, diluyentes, emulsionantes, agentes de dispersión o ligantes.

10 La composición y la formulación para la administración parenteral, intratecal o intra ventricular, pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos como, pero no limitado a, agentes que aumentan la penetración, productos transportadores y excipientes.

La composición puede formularse y utilizarse como una espuma, emulsión, microemulsión, liposomas catiónicos, sensibles al pH o cargados negativamente y transferomas.

15 De una forma general, las diferentes formulaciones pueden contener una mezcla de uno o varios agentes, como pero no limitado a, agentes que aumentan la penetración del compuesto (tensioactivos, sales biliares, agentes quelantes, tensioactivos no quelantes), excipientes (ligantes, rellenos, lubricantes, disgregantes, agentes humectantes), transportadores (agua, disoluciones salinas, alcoholes, polietilen glicol, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona). Pueden añadirse otros componentes, como colorantes, aromas, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes
20 espesantes y estabilizantes.

La dosificación depende de la gravedad y de la sensibilidad del estado de la enfermedad a tratar, con una duración de tratamiento que puede ir de algunos días a algunos meses, o hasta que la cura sea eficaz o se observe una
25 disminución de la enfermedad. La dosificación óptima puede calcularse a partir de medidas de acumulación del agente terapéutico en el cuerpo del paciente. El experto en la técnica puede determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, los métodos de dosificación y las tasas de repeticiones de estas dosificaciones. Las dosificaciones óptimas pueden variar en función de la eficacia relativa de cada oligonucleótido o ARNi, y pueden estimarse en general por la medida de las CE50 de las dosis utilizadas in vitro e in vivo en modelos animales. En general, la dosificación está comprendida entre 0,01µg y 100 g por kilo de peso corporal y puede administrarse una vez o más, de forma diaria, quincenal, mensual o anual, o incluso una vez cada 2 a 20 años.

30 Las personas competentes pueden determinar fácilmente la tasa de repetición de las dosificaciones tomando como base el tiempo de presencia del compuesto en los fluidos corporales o los tejidos. Después de que un tratamiento ha salido bien, puede ser deseable que el paciente continúe una terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la enfermedad, para hacer esto el oligonucleótido o ARNi se administran a dosis de mantenimiento que van de 0,01 µg 100 g por kilo de peso corporal, una vez o más al día hasta una vez cada 20 años.

35 La administración del antisentido in vivo se ha realizado con éxito por diversos autores, utilizando protocolos de inyección simple del antisentido por vía intravenosa (He et al. (1998) Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 12:1-4) o intracerebral (Yoburn et al. (2003) Synapse 47: 109-116, Tischkau et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 718-723). Estos dos últimos años, se han desarrollado sistemas más complejos que permiten el direccionamiento de antisentido en el organismo y se han utilizado con éxito (Morishita et al. (2002) J. Endocrinol. 175: 475-485, Bartsch et al. (2002) Pharm. Res. 19: 676-680), lo que permite en el ratón y la rata, tratar diversos cánceres (Rait et al. (2002) Mol. Med. 8: 475-486, Ochietti et al. (2002) J. Drug. Target 10: 113-121, Eder et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9:117-125). La transfección de los antisentido utiliza los mismos procedimientos que para la transfección de los ARNi, dejando prever las mismas aplicaciones in vivo para los ARNi. En esta óptica, podemos imaginar un
40 direccionamiento del antisentido o de los ARNi a nivel del sistema nervioso central, para tratar trastornos cuyo origen es central (obesidad), pero también los obtenidos por una acción periférica de los receptores de la leptina. Más particularmente, puede preverse una acción de los antisentido o de los ARNi a nivel del transporte de la leptina a través de la barrera hemato-encefálica y que implica los OB-R. Por otra parte, las células endoteliales ya se han tomado como diana con éxito con una estrategia antisentido in vivo (Bartsch et al. (2002) Pharm. Res. 19: 676-680).

Figuras:

50 Figura 1

Secuencias de los diferentes ODN antisentido utilizados AS 01 a AS 16.

Figura 2

55 Alineamiento de las secuencias proteicas de OB-RGRP de diferentes especies y de la secuencia proteica humana de MY047. Los dominios transmembrana potenciales se determinaron por diferentes métodos (HMMTOP, TMHMM, TopPred2, TMPred) y se escriben en negrita.

Figura 3

Topología de OB-RGRP estudiada por BRET, por la utilización de la doble proteína de fusión YFP-OB-RGRP-Luc. Figura 3a: representación esquemática de la topología de OB-RGRP para los modelos 3 y 4TM. Figura 3b : Resultados de los experimentos de BRET utilizando las proteínas indicadas. Los datos se expresan en mBU.

5 **Figura 4**

Estudio de la oligomerización de OB-RGRP por experimentos de SDS-PAGE e inmunoprecipitaciones. Figura 4a: Las células que expresan las proteínas de fusión indicadas se trataron o no con Ditiobis(succinimidil propionato) (DSP) 2 mmoles.L-1 en PBS (1X pH7,4) para entrecruzar los complejos proteicos. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y las proteínas de fusión con YFP se detectaron por la utilización de un anticuerpo específico anti-YFP. Figura 4b: Las células que expresan la construcción 6Myc-OB-RGRP se solubilizaron con 1 % de digitonina ó 5 % de SDS y el solubilizado se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-myc. Los precipitados se sometieron a una separación por SDS-PAGE y las proteínas etiquetadas con myc se detectaron con un anticuerpo anti-myc.

Figura 5

15 Identificación de los determinantes moleculares implicados en la oligomerización de OB-RGRP. Las proteínas de fusión con los truncamientos de OB-RGRP se trataron como se ha descrito Fig. 4b. TM, dominio transmembrana.

Figura 6

20 Estudio de la oligomerización de OB-RGRP en las células HEK vivas por la tecnología de BRET. Figura 6a: Las proteínas de fusión indicadas se co-expresaron en una relación equimolar y se realizaron experimentos de medidas de BRET. Figura 6b: Cantidades constantes del plásmido OB-RGRP-Luc se co-expresaron con cantidades crecientes del plásmido OB-RGRP-YFP y se realizaron medidas de BRET. MT2R-Luc, proteína de fusión del receptor MT2 de la melatonina con la luciferasa.

Figura 7

25 Interacción de OB-R_s y de OB-RGRP y MY047 estudiadas por BRET. Las proteínas de fusión indicadas se co-expresaron en una relación equimolar y se realizaron medidas de BRET. IR-YFP, proteína de fusión del receptor de la insulina con YFP.

Figura 8

Activación dependiente de la dosis de los genes informadores para STAT3 (Figura 8a) y STAT5 (Figura 8b) en las células HeLa, por OB-R_i en presencia de una sobreexpresión de las construcciones de la proteína OB-RGRP como se indica.

30 **Figura 9**

Efecto de la sobreexpresión de OB-RGRP sobre la expresión de OB-R en la superficie de las células. Las células HEK 293 transfectadas o no con el vector de expresión de OB-RGRP, y las células COS transfectadas con los vectores de expresión de OB-R_i o OB-R_s y +/- los vectores de OB-RGRP, se utilizaron para determinar la cantidad de receptores expresada en la superficie y el total expresado en las células por experimentos de unión de ¹²⁵I-leptina.

Figura 10

40 Efecto de diferentes oligodesoxinucleótidos (ODN) antisentido sobre el nivel de mensajeros de OB-RGRP observados por RT-PCR semi-cuantitativa. Figura 10a: determinación de la zona lineal de amplificación de transcritos de OB-RGRP y de la GAPDH, en función del número de ciclos de PCR. Figura 10b: cuantificación de los resultados mostrados en el panel a. Figura 10c: Determinación de los niveles de expresión relativos de los ARNm de OB-RGRP a 26 ciclos de PCR, en las células incubadas con los diferentes ODN antisentido.

Figuras 11

45 Efecto de diferentes ARN de interferencia sobre el nivel de los mensajeros de OB-RGRP observados por RT-PCR semi-cuantitativa. **Figura 11a:** secuencia SEQ ID N°37 /SEQ ID N°38 del ARNi sintético utilizado (homólogo para el ser humano y el ratón). **Figura 11b:** determinación de los niveles de expresión relativos de los ARNm de OB-RGRP a 26 ciclos de PCR, en las células HELA transfectadas o no con el ARNi sintético. **Figura 11c:** secuencia SEQ ID N°42 del ARNi en horquilla sintetizado a partir del vector PCR3.1-RNAi 14. **Figura 11d:** determinación de los niveles de expresión relativos de los ARNm de OB-RGRP a 26 ciclos de PCR, en las células Ltk transfectadas o no con el vector PCR3.1-RNAi 14.

50

Figura 12

Efecto de los ODN antisentido específicos de OB-RGRP sobre la activación de un gen informador STAT3. Las células HeLa se co-transfectaron, en primer lugar con el vector de expresión OB-R_i y las construcciones de los genes informadores para STAT3 ó 5, y después con los ODN antisentido indicados. Después 48 horas de estimulación o no con 10 nmoles.L-1 de leptina.

Figura 13

Efecto de los ODN antisentido específicos de OB-RGRP sobre la expresión en superficie de OB-R. Las células HeLa se transfectaron o no con los plásmidos de expresión de OB-R_i o de OB-R_s antes de una segunda transfección o no con los ODN antisentido indicados. 48 h post-transfección, se determinó la cantidad de OB-R total y la fracción expuesta en la superficie en experimentos de unión con la ¹²⁵I-leptina.

Materiales y Métodos utilizados en los ejemplos**Construcción de los plásmidos.**

Leas proteínas de fusión de los OB-R con la YFP y la luciferasa se construyeron por ligación de la YFP y de la luciferasa a la parte C-terminal de los receptores OB-R, por técnicas estándar de biología molecular. La región codificadora de la YFP se obtuvo a partir del vector Cytogem®-Topaze (pGFPTpz-N1) (Packard, Meriden, CT) y se insertó en el sitio EcoRV del vector pcDNA3/CMV (Invitrogen, Groningen, Países bajos) que contiene un policonector modificado. La región codificadora de la luciferasa de *Renilla* se obtuvo a partir del vector pRL-CMV (Promega, Madison, WI) y se insertó en el sitio EcoRV del vector pcDNA3 modificado. Las regiones codificadoras de OB-R_i y de OB-R_s (regalo del Dr. Gainsford, Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australia) se insertaron en los dos vectores descritos anteriormente, respectivamente en los sitios EcoR1/BamH1 y Nhe1. Los codones de parada se suprimieron por mutagénesis dirigida y la fase de las proteínas de fusión se ajustó al mismo tiempo.

El vector pcDNA3-OB-RGRP se obtuvo por inserción de la región codificadora de OB-RGRP, obtenida a partir del vector pcDNA3-Di1, en los sitios EcoR1 y Xba1 del vector pcDNA3/CMV (Invitrogen, Groningen, Países bajos). El codón de parada de OB-RGRP se suprimió por mutagénesis dirigida. El vector pcDNA3-OB-RGRP-Luc se obtuvo por digestión del vector pRL-CMV N3 (Promega, Madison, WI) con Sma1 y Hpa1 y por inserción del fragmento, correspondiente a la región codificadora de la luciferasa de *Renilla*, después de la región codificadora de OB-RGRP en el sitio BspE1 lleno del vector pcDNA3-OB-RGRP.

El vector pcDNA3-YFP se obtuvo por sub-clonación de la región codificadora de la YFP a partir del vector pGFPTpz-N1 (Packard, Meriden, CT) insertado en el sitio EcoRV del vector pcDNA3/CMV. El vector pcDNA3-OB-RGRP-YFP se obtuvo por inserción del fragmento BamH1/BspE1 del vector pcDNA3-OB-RGRP no parada en el vector pcDNA3-YFP digerido con las enzimas BamH1 y Age1.

La construcción pcDNA3-GFP-OB-RGRP-Luc se obtuvo por inserción del fragmento OB-RGRP-Luc del vector pcDNA3-OB-RGRP-Rluc cortado con EcoR1, en el sitio EcoR1 del vector pcDNA3-YFP. El codón de parada de la YFP se eliminó por mutagénesis dirigida.

El vector 6Myc-OB-RGRP (4TM) se obtuvo por inserción del fragmento 6myc del vector pcDNA3-RSV-6Myc, en los sitios BamH1 y EcoR1 del vector pcDNA3-OB-RGRP. Las diferentes delecciones de OB-RGRP (2 y 3 TM) se obtuvieron por PCR e inserción en el vector pcDNA3 en los sitios EcoR1 y Xba1. La región codificadora de MY047 se obtuvo por RT-PCR sobre los ARNm de origen humano. El fragmento de PCR se digirió con las enzimas de restricción EcoR1/Xba1 y se insertó en el vector pcDNA3-Topaze cortado con las mismas enzimas. El codón de parada de la YFP se eliminó por mutagénesis dirigida para obtener el vector pcDNA3-YFP-MY047. El vector pcDNA3-MY047-YFP se obtuvo por inserción del fragmento de ADN obtenido por PCR sobre el vector pcDNA3-YFP-MY047 y cortado con BamH1, e insertado en el vector pcDNA3-YFP cortado con la misma enzima. La inserción del mismo fragmento en el vector pcDNA3-Rluc cortado con BamH1 ha permitido obtener el vector pcDNA3-MY047-Rluc. Se realizaron dos reacciones de PCR consecutivas para obtener una amplificación del promotor U6 de ratón seguido de la secuencia ARNi en horquilla de secuencia SEQ ID N°42. En la primera reacción, una primera pareja de cebadores: U6 sentido, 5'-CCATCTAGGCCAAGCTTATCCGACGCCGCATCTC-3' SEQ ID N°41 y la correspondiente a la secuencia sentido de la diana seguido de una secuencia que forma el bucle (SEQ ID N°39). Este producto de PCR se utilizó en una segunda reacción con el mismo cebador con sentido (U6 sentido) y con un segundo cebador correspondiente a la secuencia anti-sentido de la diana precedido de la misma secuencia que forma el bucle (SEQ ID N°40). Los diferentes productos de PCR correspondientes a los diferentes ARNi en horquilla se insertaron en el vector PCR3.1 mediante el kit TA-cloning (INVITROGEN Groningen, Países bajos), para proporcionar los plásmidos PCR3.1-RNAi 14. Todas las construcciones se verificaron por secuenciación.

Cultivo celular y transfección.

Las células HEK 293, COS-7- y HeLa se cultivaron en DMEM suplementado con 10 % (v/v) de SVF, 4,5 g/litro de glucosa, 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomina, 1 mmol.L-1 de glutamina (todos de Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las transfecciones transitorias se realizaron con el reactivo FuGene 6 (Roche, Basilea, Suiza)

según las instrucciones del suministrador, salvo para las células Ltk. Estas últimas se transfectaron por la técnica de DEAE Dextrano : las células se lavan dos veces con PBS y se añade sobre las células 1 ml de una mezcla de 2µg de ADN, DMEM, Hepes 20 mM, 4,5 g/litro de glucosa y 200µg de DEAE-dextrano. Después de una incubación de 8 horas, el medio se retira y las células se incuban durante 1'30" con 1 ml de DMEM, 4,5 g/litro de glucosa y 10 % DMSO. Las células se lavan finalmente y se incuban con el medio de cultivo.

Preparación de las membranas y solubilización.

Las membranas se prepararon como se ha descrito anteriormente (19), y se resuspendieron en Tris 75 mmoles.L-1 (pH 7,4), MgCl₂ 12,5 mmoles.L-1, y EDTA 5 mmoles.L-1 y se utilizaron inmediatamente en los experimentos de BRET.

SDS PAGE y transferencia Western.

Los lisados totales se prepararon por lavado de las células una vez con PBS frío (pH 7,4) y se desnaturalizaron por adición de tampón de depósito (30mmoles.L-1 Tris HCl pH 6,8, 1 % glicerol 5 % SDS, 50 mmoles.L-1 DTT y 0,05 % azul de bromofenol). Los lisados totales o los inmunoprecipitados se incubaron durante 10 minutos a 90°C y se depositaron sobre gel de acrilamida 10 % para una separación por electroforesis (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron con anticuerpos primarios específicos: anti-YFP (8367-1 Living Colors) a 1/200, anti-myc A14 (sc-789 TEBU Peprotech Santa Cruz Biotechnology) a 1/500, y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (IgG de cabra anti-conejo; Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Baltimore Pike) a 1/10.000. Las bandas inmuno-reactivas se revelaron con un kit ECL (Pharmacia Biotech).

Inmunoprecipitación.

Dos días después de la transfección, las células se lavaron una vez con PBS frío y las proteínas se extrajeron por una incubación durante 15 minutos en tampón de lisis (PBS 1X, Nonidet P40 1 %, Desoxicolato de Sodio 0,5 %, SDS 0,1 %, NaN₃ 0,02 %, benzamidina 10 mg.L-1 e inhibidores de tripsina 5 mg.L-1). El lisado se centrifugó a 18.000 g durante 15 min y el sobrenadante se incubó durante 3 horas a 4°C con un anticuerpo anti-myc acoplado a bolas de agarosa (sc-40ACTEBU preprotech, Santa CRUZ Biotechnology). Los precipitados se lavaron tres veces con tampón de lisis frío y se desnaturalizaron con tampón de depósito para SDS-PAGE.

Experimentos de radiounión.

Los experimentos de radiounión se realizaron como se ha descrito anteriormente (Barr et al. (1999) J Biol Chem, 274, 21416-21424), con ligeras modificaciones. Para determinar la unión de la leptina en superficie, las células cultivadas en placas de 6 pocillos se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron en el tampón de unión (DMEM, 25 mmoles.L-1 Hepes pH 7,4, 1 % BSA) que contiene 100.000 cpm/pocillo de ¹²⁵I-leptina (PerkinElmer life sciences, París, Francia) en presencia o no de 200 nmoles.L-1 de leptina (PeproTech Inc, EEUU) durante 4 h a 4°C. Las células se lavaron dos veces con PBS frío, se lisaron en NaOH 1 N, y la radiactividad se determinó en un contador γ. Para determinar la unión total de la leptina, las células cultivadas en los botes de 10 cm de diámetro se solubilizaron en 1,5 ml de tampón de unión que contiene 0,15% de digitonina durante 2 h a 4°C. Los extractos se centrifugaron 30 min a velocidad máxima y a 4°C. Los sobrenadantes (0,2ml) se incubaron con 100.000 cpm de ¹²⁵I-leptina en presencia o no de 200 nmoles.L-1 de leptina, en un volumen total de 0,25 ml en rotación constante a 4°C durante una noche. Se añadieron 0,5 ml de γ-globulina (1,25 mg/ml) y 0,5 ml de polietilen glicol 6000 (25 % p/v) para precipitar los complejos receptores-ligandos, que se centrifugaron a 17.000 g durante 3 min. El sedimento se lavó una vez con 1ml de polietilen glicol 6000 (12 % p/v) y la radiactividad se determinó en un contador γ.

Ensayo de activación de los genes informadores.

Las células HeLa cultivadas en los pocillos de placas de 6 pocillos se co-transfectaron con 500 ng de un plásmido informador que expresa la luciferasa de luciérnaga bajo el control de elementos de respuesta para los factores STAT3 o STAT5, (regalo del Dr. Levy, Universidad de Nueva York, Nueva York, EEUU), 250 pg del vector de expresión pcDNA3-luciferasa de *Renilla* (utilizado como estándar interno entre las muestras) y con 500 ng de los diferentes vectores de expresión de OB-R o el vector solo. 48 h después de la transfección, las células se pusieron sin suero durante una noche en medio Otpimem (Invitrogen, Groningen, Países bajos) que contiene 1 % de BSA, antes de la estimulación o no con 10 nmoles.L-1 de leptina durante 48 h. Las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron en tampón de lisis pasiva (Promega Corporation, Madison, WI) durante 15 min a temperatura ambiente. Los lisados totales se centrifugaron durante 2 min a 15.000 g y los sobrenadantes se utilizaron en un ensayo de medida de luciferasa (Dual Luciferase Assay System de Promega Corporation, Madison, WI) utilizando un luminómetro Berthold (Lumat LB 9507). Los resultados se expresan respecto a las actividades de la luciferasa de luciérnaga sobre la luciferasa de *Renilla*.

Medidas de BRET en microplacas.

48 h después de la transfección, las células COS-7, HeLa o HEK 293 que expresan las proteínas de fusión de OB-R se despegaron y se lavaron en PBS. 1-2x10⁵ células se distribuyeron en pocillos de placas optiplat (96 pocillos, Packard Instrument Company, Meriden, CT) en presencia o no de los ligandos y se incubaron a 25°C. De forma

alternativa, hemos procedido de la misma forma con membranas preparadas a partir de las células que expresan las diferentes construcciones. El sustrato, la Coelenterazina h (Molecular Probes, Eugene, OR) se añadió a una concentración final de 5 μ moles.L-1 y las lecturas se realizaron con un lumino/fluorímetro Fusion™ (Packard Instrument Company, Meriden, CT) que permite la medida de la luminiscencia a través de dos filtros (filtro Luciferasa: 485 $\pm$ 10 nm; filtro YFP: 530 $\pm$ 12,5 nm). La relación de BRET se definió como la diferencia de emisión a 530 nm/485 nm de las células co-transfectadas con las proteínas de fusión Luc y YFP y la emisión a 530 nm/485 nm de la proteína de fusión Luc transfectada sola en las células. Los resultados se expresan en unidades de miliBRET (mBU), 1 mBRET corresponde a los valores de las diferencias de las relaciones multiplicados por 1.000.

RT-PCR.

Los ARN totales se extrajeron por el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski P., y Sacchi N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159). 1 μ g de ARN se desnaturaliza durante 5 minutos a 68°C y se enfría brutalemente durante 5 min a 4°C. La muestra desnaturalizada se transcribe de forma inversa durante 1 h a 37°C en 20 μ l de medio de reacción RT (5 μ moles.L-1 PdN6, 10 μ moles.L-1 DTT, 50mmoles.L-1 Tris-HCl pH=8,3, 75mmoles.L-1 KCl, 5mmoles.L-1 MgCl₂, 500 μ moles.L-1 dNTP, 200U RT-MMLV). Una alícuota de 2,5 μ l de esta reacción se utiliza para una reacción de PCR en un volumen final de 25 μ l (40mmoles.L-1 Tris-HCl pH 8,4; 100 mmoles.L-1 KCl; 1,5 mmoles.L-1 MgCl₂; 0,2mmoles.L-1 de cada dNTP; 0,141 mmoles. L-1 de cebadores específicos de OB-RGRP (con sentido humano: CCGTGGCAGGAAGC **SEQ ID N°43**, con sentido murino: GCAGCGACAGCCCCAGCTCC **SEQ ID N°44** antisentido: CAGCCACACGAGCAAG **SEQ ID N°45**), y 0,035mmoles.L-1 de cebadores específicos de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (con sentido: GGAGAAGGCTGGGGC **SEQ ID N°46**, antisentido: GATGGCATGGACTGTGG **SEQ ID N°47**) y 2,5U de TAQ ADN polimerasa). El protocolo siguiente se utilizó para la reacción de PCR : Desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, y 22 a 30 ciclos de desnaturalización (20 seg a 94°C), hibridación (20 seg a 59°C), elongación (20 seg a 72°C) seguido de una elongación final de 7 min a 72°C.

Una alícuota de la reacción de PCR se depositó en un gel de agarosa al 2% para separar los productos de la reacción por electroforesis. Los tamaños esperados de los fragmentos de la GAPDH y de OBR-GRP son respectivamente 229 pb y 334 pb.

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador automático de ADN (modelo 8909 "Expedite MOSS" de Applied Biosystems) por química estándar de fosforamiditas y oxidación con yodo. La desmetilación se efectuó con una disolución de 0,2 moles.L-1 de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona 1,1-dióxido en acetonitrilo durante 120 s. La liberación del soporte y la desprotección se realizaron en amoniaco concentrado (18 h a 55°C), y los oligonucleótidos se purificaron por precipitación. El producto de desprotección se precipitó con 10 volúmenes de 1-butanol; el sedimento recogido en un volumen de NaCl a 0,3 moles.L-1 se precipitó por la adición de 4 volúmenes de etanol.

El análisis por gel de poliacrilamida al 20 % (en tampón urea 8 moles.L-1 y Tris-borato 454 mmoles.L-1 a pH 7,0) mostró una proporción superior al 80 % de producto de la longitud esperada.

Transfección de los OligoDesoxiNucleótidos antisentido y del dúplex de ARN de interferencia sintéticos.

Para la transfección de 300.000 células cultivadas en un pocillo de placa de 6 pocillos, se diluyeron 10 μ L de ODN antisentido a 20 μ moles.L-1 ó 10 μ L del dúplex de ARN de interferencia a 20 μ M en 175 μ L de DMEM. Se incubaron 3 μ L de oligofectamina (Invitrogen, Groningen, Países bajos) y 12 μ L de DMEM en un segundo tubo durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla oligofectamina / DMEM se añade al ODN antisentido diluido, se agita y se incuba 20 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo, las células se lavan una vez con PBS, una vez con DMEM, y se recubren con 800 μ l de DMEM. La mezcla ODN / oligofectamina se añade gota a gota sobre las células y se incuba 4h a 37°C antes de añadir 500 μ l de DMEM suplementado con 30 % de suero.

Ejemplo 1: Topología y localización celular de OB-RGRP.

Para estudiar la topología y localización subcelular de OB-RGRP, hemos etiquetado la proteína con la variante amarilla de la Proteína Verde Fluorescente (YFP) en el extremo de su cola C-terminal. La proteína de fusión se expresó en las células HeLa y su localización se determinó por microscopía de fluorescencia.

Los resultados muestran que la proteína de fusión se dirige preferentemente a nivel de las membranas perinucleares y en las vesículas intracelulares. Se observaron resultados similares en las células HEK. No se observó ninguna co-localización con proteínas citoplásmicas y nucleares, lo que confirma la localización de OB-RGRP a nivel de las membranas (no mostrado). La naturaleza exacta del compartimento de membrana se determinó por estudios de co-localización con marcadores específicos de compartimentos subcelulares. Se observó una fuerte co-localización con la cadena invariable de las proteínas de clase II de CMH, un marcador del compartimento endocítico.

El análisis inicial de la topología de OB-RGRP sugirió una organización en 3 dominios transmembrana (TM) Baillieu et al (1997) Nucleic Acids Research 25, 2752-2758). Una organización similar se ha propuesto para MY047 (Huang et al. 2001) Biochimica et Biophysica acta. Gene structure and expression 327-331). Sin embargo, un nuevo análisis del perfil de hidrofobicidad de diferentes secuencias proteicas disponibles para OB-RGRP y MY047 es también

compatible con un modelo de 4 TM (Fig. 2). La topología difiere profundamente entre estos dos modelos. En el modelo de 3 TM, los extremos N- y C-terminales están localizados en cada lado de la membrana, mientras que en el modelo de 4 TM, las dos colas están orientadas al mismo lado de la membrana (Fig. 3a). Para determinar el modelo correcto, hemos utilizado el método de transferencia de energía por resonancia (BRET), que se ha desarrollado recientemente para seguir las interacciones proteína-proteína en las células vivas (Xu et al. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96, 151-156). En el caso de proximidad física ($< 100 \text{ \AA}$) entre las dos proteínas que interactúan, puede tener lugar una transferencia de energía entre la donadora de energía (Luc) y la aceptora de energía (YFP), fusionadas a las dos proteínas de interés. Hemos etiquetado la cola N-terminal de OB-RGRP con YFP, la cola C-terminal con la luciferasa y hemos observado la transferencia de energía por medidas de BRET con esta doble proteína de fusión. El modelo de 3 TM no permite la transferencia porque los dos compañeros de BRET están separados por la bicapa lipídica. El modelo de 4 TM al contrario prevé una fuerte transferencia de energía porque los dos compañeros están localizados en el mismo lado de la membrana. Como se muestra en la figura 3b, se detectó una transferencia de energía muy fuerte para la doble proteína de fusión en las células intactas, lo que indica que OB-RGRP posee 4 TM.

El conjunto de estos resultados sugiere que OB-RGRP es una proteína de membrana con 4 dominios transmembrana, que posee 3 bucles cortos y extremos N- y C-terminales cortos orientados al mismo lado de la membrana. OB-RGRP está localizada mayoritariamente en compartimentos intracelulares.

Ejemplo 2: Oligomerización de OB-RGRP.

La oligomerización es una propiedad común a diferentes proteínas incluidas las proteínas de membrana como los receptores tirosina quinasa, los receptores de las citoquinas y las fosfotirosinas fosfatasa. Se ha mostrado que esta oligomerización juega un papel importante en la función de estas proteínas. Para obtener los elementos en la función de OB-RGRP, hemos querido saber si esta proteína oligomeriza.

OB-RGRP se etiquetó con YFP en su cola C-terminal y se expresó en las células HeLa. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condición desnaturalizante (PAGE-SDS) y se realizaron experimentos de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-YFP. La figura. 4a revela varias bandas específicas de OB-RGRP-YFP, correspondientes a las formas monoméricas, dimericas y complejos oligoméricos. Se obtuvieron resultados similares con OB-RGRP etiquetada en N-terminal bien con YFP o un epítipo myc (Fig. 4 a,b). La formación de los oligómeros de OB-RGRP se observó en los extractos celulares totales después de la inmunoprecipitación. La utilización de un agente de entrecruzamiento sobre las células enteras, estabiliza los complejos dimericos, lo que indica que la forma dimerica es la forma predominante de OB-RGRP en las células intactas (Fig. 4a).

De forma sorprendente, OB-RGRP tiene propiedades inesperadas porque los oligómeros son estables en presencia de diferentes agentes desnaturalizantes y/o disociantes como SDS 5 %, Tritón X-100 1 %, Nonidet P40 1 %, digitonina 1 %, DTT 50 mmol.L⁻¹ y β -mercaptoetanol 2 %. Sin embargo, se obtuvieron observaciones similares para otras proteínas de membrana como la glicoforina A y los receptores β 2-adrenérgicos acoplados a proteínas G. Los estudios sobre estas proteínas muestran respectivamente que los restos LIXXGVXXG y LXXXGXXXGXXXL en los dominios transmembrana son esenciales para la formación de los oligómeros. Se han identificado restos similares en las regiones de membrana de OB-RGRP.

Para identificar los determinantes moleculares implicados en la dimerización, hemos realizado construcciones de OB-RGRP que presentan deleciones progresivas de la cola C-terminal (Fig. 5). Una construcción que contiene los dos primeros TM potenciales pierde la capacidad de formar oligómeros. La adición del 3^{er} TM restaura la posibilidad de formar dímeros. Sin embargo, el perfil completo de oligomerización sólo se ha observado en presencia de los 4 TM potenciales.

Los oligómeros de proteínas de membrana pueden ser artefactos inducidos durante la preparación de las muestras (solubilización, desnaturalización etc.). Por esto es importante verificar la oligomerización de las proteínas en células vivas. Las técnicas de transferencia de energía desarrolladas recientemente como BRET permiten seguir dichas interacciones proteínas-proteínas en células vivas. Las proteínas de fusión de OB-RGRP con la luciferasa y YFP se han utilizado para seguir la oligomerización de OB-RGRP en células vivas. La co-expresión de las construcciones OB-RGRP-YFP o YFP-OB-RGRP con la construcción OB-RGRP-Luc induce una transferencia de energía (Fig. 6a). La especificidad de esta interacción se ha mostrado por la ausencia de transferencia de energía durante la co-expresión con dos proteínas de fusión diferentes: la β arrestina2-YFP (Angers et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 3684-3689), o el receptor MT2 de la melatonina-Luc (Ayoub et al. (2002) J Biol Chem 277, 21522-21528) . Hemos expresado diferentes relaciones de los compañeros de BRET (Fig. 6b). La señal de BRET aumenta de forma hiperbólica en función de la relación OB-RGRP-YFP / OB-RGRP-Luc, alcanzando una asíntota que corresponde a la saturación de las moléculas donadoras de energía (OB-RGRP-Luc) por las moléculasceptoras (OB-RGRP-YFP), lo que se espera en el caso de una interacción específica.

Colectivamente, estos resultados muestran que OB-RGRP es una proteína de membrana dimerica que también puede estar implicada en complejos oligoméricos de muy alto peso molecular. El 3er y 4o dominios transmembrana potenciales parecen ser importantes para la formación de los oligómeros.

Ejemplo 3: Interacción entre los OB-R y OB-RGRP y MYO47.

Hemos utilizado la tecnología BRET para estudiar una posible interacción entre los OB-R y OB-RGRP en células vivas. Se observó una transferencia de energía de forma constitutiva en las células que co-expresan la construcción OB-R_s-Luc y la construcción OB-RGRP-YFP lo que indica una proximidad de los compañeros de interacción (Fig. 7). Los mismos resultados se obtuvieron en las células que co-expresan OB-R_s-Luc y la construcción MYO47-YFP, así como en la orientación inversa : en las células que co-expresan OB-RGRP-Luc y OB-R_s-YFP, o en las células que co-expresan MYO47-Luc y OB-R_s-YFP. La especificidad de estas interacciones se confirmó por la ausencia de transferencia de energía entre OB-R_s-Luc, OB-RGRP-Luc, MYO47-Luc y una construcción del receptor de la insulina etiquetado con YFP (Boute et al. (2001) Mol Pharmacol 60, 640-645), así como en la orientación inversa : por la ausencia de transferencia de energía entre una construcción del receptor de la insulina etiquetado con Luc y las construcciones OB-R_s-YFP, OB-RGRP-YFP y MYO47-YFP. La co-expresión de OB-R_s-Luc y una construcción de OB-RGRP o de MYO47 que presenta la etiqueta YFP en N-terminal no provoca señal significativa, lo que confirma la especificidad de la interacción con OB-RGRP-YFP y MYO47 e indica que el extremo N-terminal de OB-RGRP y MYO47 debe estar implicado en la interacción con OB-R.

No se observó ninguna transferencia de energía significativa en las células que co-expresan las construcciones OB-R_i-Luc y OB-RGRP-YFP o YFP-OB-RGRP.

Esto no es debido a una ausencia de expresión funcional OB-R_i-Luc porque se observó una señal de BRET específica en las células que co-expresan OB-R_i-YFP para seguir la dimerización de los OB-R. La ausencia de BRET entre las proteínas de fusión OB-R_i-Luc y OB-RGRP-YFP no excluye una interacción directa entre estas dos proteínas porque ésta puede explicarse por el hecho de que la distancia entre los dos compañeros de BRET (Luc y YFP) sea más grande que 100 Å, la distancia máxima que permite obtener una transferencia. Éste debe ser el caso porque los extremos N- y C-terminales de OB-RGRP deben estar localizados cerca de la región transmembrana de los OB-R, mientras que el extremo C-terminal de OB-R_i debe apuntar lo más probablemente hacia el citoplasma a causa de su larga cola intracelular de aproximadamente 300 aminoácidos. Habida cuenta que las isoformas corta y larga de los OB-R comparten las mismas regiones trans- y yuxta-membrana y que la interacción de OB-RGRP con OB-R_s está localizada a este nivel, es probable que OB-RGRP interaccione con OB-R_i de la misma manera que con OB-R_s.

Ejemplo 4: Efecto de la sobreexpresión de OB-RGRP sobre la señalización de los OB-R.

Se co-expresaron construcciones que contienen elementos de respuesta para STAT3- o STAT5-en 5' respecto a un gen informador luciferasa con OB-R_i en ausencia o en presencia de diferentes construcciones de OB-RGRP (Fig. 8). Las dos construcciones se activaron con la leptina de forma dependiente de la dosis con una CE50 de aproximadamente 50 pM. Se obtuvieron resultados similares en las células HEK 293 que expresan de forma estable un gen informador para STAT3. La sobreexpresión de diferentes construcciones de OB-RGRP no tuvo efecto reproducible sobre esta activación lo que indica que OB-RGRP no es un factor limitante.

Ejemplo 5: Efecto de la sobreexpresión de OB-RGRP sobre la expresión de los OB-R en la superficie.

En las levaduras knock-out para OB-RGRP (Vps55), el transporte de proteínas está alterado entre el golgi y las vacuolas (Belgareh-Touze et al. (2002) Molecular Biology Of The Cell 13, 1694-1708). Aunque los OB-R se activen únicamente cuando se expresan en la membrana plásmica, una cantidad importante de receptores se acumula en los compartimentos intracelulares (Barr, et al. (1999) J Biol Chem, 274, 21416-21424)(Lundin et al. (2000) Biochimica et Biophysica Acta 1499, 130-138). Es por esto por lo que hemos ensayado los efectos de la sobreexpresión de OB-RGRP sobre la expresión de los OB-R en la superficie de las células.

El reparto de los receptores se estudió por experimentos de unión de ¹²⁵I-leptina. De acuerdo con otros autores (Barr et al. 1999), hemos mostrado que solamente 10 - 20 % de los receptores OB-R_i y OB-R_s se expresan en la superficie de las células COS transfectadas (Fig. 9) y las células HeLa. Esto no es un artefacto debido a la expresión de receptores exógenos porque se obtienen valores similares en las células HEK 293 que expresan receptores endógenos OB-R (Fig. 9). La sobreexpresión de OB-RGRP no ha mostrado modificación de la cantidad total en las células ni el % de receptores expresados en la superficie (Fig. 9).

Ejemplo 6: Caracterización de desoxinucleótidos antisentido específicos de OB-RGRP

OB-RGRP parece tener una expresión ubicua, es por esto por lo que la disminución de la expresión de esta proteína se eligió como estrategia alternativa para estudiar su papel en la función de los OB-R. Catorce antisentido específicos para OB-RGRP (AS 1 a 14 ; SEQ ID N°22 a SEQ ID N°34 y SEQ ID N°2) y dos antisentido aleatorios (AS 15 y 16 ; SEQ ID N°35 y SEQ ID N°36) se eligieron (véase la Figura 1), se sintetizaron y se ensayaron para su capacidad de inhibir la expresión de OB-RGRP por experimentos de RT-PCR semi-cuantitativa en las células HeLa que expresan OB-RGRP de forma endógena (Fig. 10). Sólo uno de estos antisentido (AS-14), derivado de la región 3' no traducida del ARNm de OB-RGRP interfiere con la expresión de OB-RGRP. El marcaje de este antisentido con el fluoróforo Cy3 ha permitido mostrar que el conjunto de las células se transfectaba con nuestras condiciones experimentales, durante nuestros diferentes experimentos.

Ejemplo 7: Efecto de los diferentes ARN de interferencia sobre el nivel de los mensajeros de OB-RGRP observados por RT-PCR semi-cuantitativa.

Con el fin de disminuir la expresión de OB-RGRP, una estrategia alternativa ha sido utilizar ARN de interferencia. Para esto, hemos utilizado por una parte una secuencia candidata ARN de interferencia sintética dirigida a la vez contra la secuencia humana y murina (figura 11a) ; y por otra parte, un vector (PCR3.1-RNAi 14) que expresa un ARN de interferencia en horquilla dirigido contra una secuencia murina de OB-RGRP (figura 11c).

La capacidad de los ARNi para disminuir la expresión de OB-RGRP endógena se ensayó por RT-PCR.

El ARNi sintético transfectado en las células HELA (de origen humano) provoca una disminución de la expresión de OB-RGRP humana.

La transfección del vector PCR3.1-RNAi-14 provoca el mismo efecto en las células L (de origen murino).

Ejemplo 8: Efecto del antisentido específico de OB-RGRP sobre la señalización y la expresión en superficie de los OB-R.

Las células HeLa se co-transfectaron en primer lugar con los vectores de expresión de OB-R_i y el gen informador para STAT3 y después con los antisentido. La leptina provoca un aumento de la activación basal del gen informador para STAT 3 de aproximadamente 1,5 veces en las células control sin antisentido, o con un antisentido control (AS16) (Fig. 12). En las células transfectadas con el antisentido específico para OB-RGRP (AS-14), la señalización basal y estimulada por la leptina aumenta relativamente respecto a las condiciones control. Esto muestra que la activación de la vía JAK/STAT aumenta en las células que presentan una disminución de la expresión de OB-RGRP. Estas observaciones pueden explicarse por un efecto inhibitorio de OB-RGRP sobre la actividad basal y estimulada de los OB-R, y en este caso, OB-RGRP puede considerarse como un regulador de la señalización de los OB-R. Otra alternativa es que OB-RGRP podría regular la expresión de los receptores en superficie limitando el número de OB-R que alcanzan la superficie de las células. Esto está de acuerdo con el hecho de que solamente 10 a 20 % de los receptores expresados alcanzan la superficie celular. En esta hipótesis, la disminución de la expresión de OB-RGRP debería aumentar el número de receptores en la superficie de las células, lo que debería aumentar la señalización por estos receptores. Para ensayar esta hipótesis, hemos cuantificado el número de receptores OB-R_i y OB-R_s expresados en la superficie de las células en presencia (control) y en ausencia (AS-14) de OB-RGRP (Fig. 13). La transfección del antisentido aleatorio no mostró efecto sobre el número de receptores expresados en la superficie de las células, mientras que la del antisentido específico (AS-14) provocó un aumento de 3 veces en el número de los OB-R expresados en la membrana plásmica. Se obtuvieron resultados similares en las células HeLa no transfectadas que expresan receptores endógenos. En estas condiciones experimentales, el número total de receptores, medido por experimentos de unión de ¹²⁵I-leptina, no mostró variaciones significativas.

El conjunto de nuestros resultados es consistente con el papel de OB-RGRP en la levadura, en el transporte de proteínas. El aumento de la expresión en superficie de los OB-R parece implicado en el aumento de la señalización observado. Sin embargo, no podemos excluir totalmente la hipótesis de que OB-RGRP regula directamente la actividad de los OB-R. La aplicación de antisentido específicos dirigidos contra OB-RGRP debería ser útil para aumentar la señalización de los OB-R en los trastornos asociados con la leptina, como la obesidad humana en la que se observa una resistencia a la leptina, caracterizada por una respuesta inadaptada a esta hormona. El aumento de la expresión de los receptores en la superficie de las células y de su señalización debe ser importante para aumentar la respuesta a la leptina en el caso de la obesidad humana, en primer lugar por aumento del transporte de la leptina hacia el cerebro a través de la barrera hemato-encefálica y en segundo lugar por un aumento de la señalización de los OB-R a nivel del hipotálamo. La interacción entre OB-RGRP y OB-R_s permite suponer que la acción de OB-RGRP se hace por esta interacción directa con los receptores y que impedir ésta puede dar lugar a reproducir los efectos del ODN antisentido específico. Proponemos utilizar el ensayo de BRET de las interacciones entre OB-RGRP y OB-R_s, y MYO47 y OB-R_s descrito más arriba, como ensayo de cribado de moléculas que pueden modular esta interacción. Este ensayo podrá realizarse bien sobre células enteras o permeabilizadas, que co-expresan las proteínas de fusión de los compañeros de BRET OB-RGRP y OB-R_s o MYO47 y OB-R_s, bien sobre fracciones de membrana obtenidas de estas células.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AVENTIS PHARMA S.A.
 CNRS
 INSERM

5 <120> OB RGRP

<130> FRAV2003/0005

<160> 47

<170> PatentIn versión 3.1

10 <210> 1

<211> 648

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cactttattc tgattacagt gcattgaatt tcttagaact catactatct gtatacatgt      60
gcacatgcgg cattttacta tgaaatttaa tatgctgggt tttttaatac ctttatatat      120
catgttcact ttaagaaaga cttcataagt aggagatgag ttttattctc agcaaataga      180
cctgtcaa at ttagattatg ttactcaa at tatgttactt gtttggctgt tcatgtagtc      240
acggtgctct cagaaaatat attaacgcag tcttgtaggc agctgccacc ttatgcagtg      300
catcgaaacc ttttgcttgg ggatgtgctt ggagaggcag ataacgctga agcaggcctc      360
tcatgaccca ggaaggccgg ggtggatccc tctttgtgtt gtagtccatg ctattaaaag      420
tgtggcccac agaccaagag cctcaacatt tcctagagcc ttattagaaa tgcagaatct      480
gaagccccac tctggaccca ggacattttg atgagatcca aaggagtgtg atgcacatga      540
aagtttgaga agcatcatca tagagaagta aacatcacac ccaacttcct tatctttcca      600
gtggctaaac cacttaacct ctctgggtgt tacctgctca tttgttta      648

```

15 <210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> AS14

<220>

<221> característica_misc

<223> antisentido AS14

<400> 2

25 20 aatgccgcat gtgcacatgt

<210> 3

<211> 396

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(396)

<223>

<400> 3

ES 2 385 712 T3

atg gcg ggc gtt aaa gct ctc gtg gca tta tcc ttc agt ggg gct att Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile 1 5 10 15	48
gga ctg act ttt ctt atg ctg gga tgt gcc tta gag gat tat ggc gtt Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val 20 25 30	96
tac tgg ccc tta ttc gtc ctg att ttc cac gcc atc tcc ccc atc ccc Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro 35 40 45	144
cat ttc att gcc aaa aga gtc acc tat gac tca gat gca acc agt agt His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser 50 55 60	192
gcc tgt cgg gaa ctg gca tat ttc ttc act act gga att gtt gtt tct Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser 65 70 75 80	240
gcc ttt gga ttt cct gtt att ctt gct cgt gtg gct gtg atc aaa tgg Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp 85 90 95	288
gga gcc tgc ggc ctt gtg ttg gca ggc aat gca gtc att ttc ctt aca Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr 100 105 110	336
-	
att caa ggg ttt ttc ctt ata ttt gga aga gga gat gat ttt agc tgg Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp 115 120 125	384
gag cag tgg tag Glu Gln Trp 130	396

5
<210> 4
<211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 385 712 T3

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

<210> 5

<211> 1359

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> OB RGRP LUC

<220>

<221> característica_misc

10 <223> OB RGRP LUC

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1359)

<223>

15 <400> 5

ES 2 385 712 T3

atg gcg ggc gtt aaa gct ctc gtg gca tta tcc ttc agt ggg gct att Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile 1 5 10 15	48
gga ctg act ttt ctt atg ctg gga tgt gcc tta gag gat tat ggc gtt Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val 20 25 30	96
tac tgg ccc tta ttc gtc ctg att ttc cac gcc atc tcc ccc atc ccc Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro 35 40 45	144
cat ttc att gcc aaa aga gtc acc tat gac tca gat gca acc agt agt His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser 50 55 60	192
gcc tgt cgg gaa ctg gca tat ttc ttc act act gga att gtt gtt tct Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser 65 70 75 80	240
gcc ttt gga ttt cct gtt att ctt gct cgt gtg gct gtg atc aaa tgg Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp 85 90 95	288
gga gcc tgc ggc ctt gtg ttg gca ggc aat gca gtc att ttc ctt aca Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr 100 105 110	336
att caa ggg ttt ttc ctt ata ttt gga aga gga gat gat ttt agc tgg Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp 115 120 125	384
gag cag tgg att ccg ggg gat cca ccg gct aga gcc acc atg acc agc Glu Gln Trp Ile Pro Gly Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser 130 135 140	432
aag gtg tac gac ccc gag cag agg aag agg atg atc acc ggc ccc cag Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln 145 150 155 160	480
tgg tgg gcc agg tgc aag cag atg aac gtg ctg gac agc ttc atc aac Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn 165 170 175	528
tac tac gac agc gag aag cac gcc gag aac gcc gtg atc ttc ctg cac	576

ES 2 385 712 T3

Tyr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn	Ala	Val	Ile	Phe	Leu	His		
			180					185					190				
ggc	aac	gcc	gct	agc	agc	tac	ctg	tgg	agg	cac	gtg	gtg	ccc	cac	atc	624	
Gly	Asn	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Trp	Arg	His	Val	Val	Pro	His	Ile		
		195					200					205					
gag	ccc	gtg	gcc	agg	tgc	atc	atc	ccc	gat	ctg	atc	ggc	atg	ggc	aag	672	
Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Ile	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Lys		
	210					215					220						
agc	ggc	aag	agc	ggc	aac	ggc	agc	tac	agg	ctg	ctg	gac	cac	tac	aag	720	
Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys		
	225				230				235						240		
tac	ctg	acc	gcc	tgg	ttc	gag	ctc	ctg	aac	ctg	ccc	aag	aag	atc	atc	768	
Tyr	Leu	Thr	Ala	Trp	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Lys	Ile	Ile		
				245					250					255			
ttc	gtg	ggc	cac	gac	tgg	ggc	gcc	tgc	ctg	gcc	ttc	cac	tac	agc	tac	816	
Phe	Val	Gly	His	Asp	Trp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Ser	Tyr		
			260					265					270				
gag	cac	cag	gac	aag	atc	aag	gcc	atc	gtg	cac	gcc	gag	agc	gtg	gtg	864	
Glu	His	Gln	Asp	Lys	Ile	Lys	Ala	Ile	Val	His	Ala	Glu	Ser	Val	Val		
		275					280					285					
gac	gtg	atc	gag	agc	tgg	gac	gag	tgg	cca	gac	atc	gag	gag	gac	atc	912	
Asp	Val	Ile	Glu	Ser	Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ile		
	290					295					300						
gcc	ctg	atc	aag	agc	gag	gag	ggc	gag	aag	atg	gtg	ctg	gag	aac	aac	960	
Ala	Leu	Ile	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asn		
	305				310					315					320		
ttc	ttc	gtg	gag	acc	atg	ctg	ccc	agc	aag	atc	atg	aga	aag	ctg	gag	1008	
Phe	Phe	Val	Glu	Thr	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ile	Met	Arg	Lys	Leu	Glu		
				325					330					335			
ccc	gag	gag	ttc	gcc	gcc	tac	ctg	gag	ccc	ttc	aag	gag	aag	ggc	gag	1056	
Pro	Glu	Glu	Phe	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Phe	Lys	Glu	Lys	Gly	Glu		
			340					345					350				
gtg	aga	aga	ccc	acc	ctg	agc	tgg	ccc	aga	gag	atc	ccc	ctg	gtg	aag	1104	
Val	Arg	Arg	Pro	Thr	Leu	Ser	Trp	Pro	Arg	Glu	Ile	Pro	Leu	Val	Lys		
		355					360					365					
ggc	ggc	aag	ccc	gac	gtg	gtg	cag	atc	gtg	aga	aac	tac	aac	gcc	tac	1152	
Gly	Gly	Lys	Pro	Asp	Val	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Asn	Tyr	Asn	Ala	Tyr		
	370					375					380						
ctg	aga	gcc	agc	gac	gac	ctg	ccc	aag	atg	ttc	atc	gag	agc	gac	ccc	1200	
Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Asp	Leu	Pro	Lys	Met	Phe	Ile	Glu	Ser	Asp	Pro		
	385				390					395					400		
ggc	ttc	ttc	agc	aac	gcc	atc	gtg	gag	ggc	gcc	aag	aag	ttc	ccc	aac	1248	
Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Ala	Ile	Val	Glu	Gly	Ala	Lys	Lys	Phe	Pro	Asn		
				405				410						415			
acc	gag	ttc	gtg	aag	gtg	aag	ggc	ctg	cac	ttc	agc	cag	gag	gac	gcc	1296	
Thr	Glu	Phe	Val	Lys	Val	Lys	Gly	Leu	His	Phe	Ser	Gln	Glu	Asp	Ala		
			420					425					430				
ccc	gac	gag	atg	ggc	aag	tac	atc	aag	agc	ttc	gtg	gag	aga	gtg	ctg	1344	
Pro	Asp	Glu	Met	Gly	Lys	Tyr	Ile	Lys	Ser	Phe	Val	Glu	Arg	Val	Leu		
		435					440					445					
aag	aac	gag	cag	taa												1359	

Lys Asn Glu Gln
450

<210> 6
<211> 452

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> OB RGRP LUC

5 <220>
<221> característica_misc
<223> OB RGRP LUC

<400> 6

Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile
1 5 10 15

Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val
20 25 30

Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro
35 40 45

His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser
50 55 60

Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
65 70 75 80

Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp
85 90 95

Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr
100 105 110

Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp
115 120 125

Glu Gln Trp Ile Pro Gly Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser
130 135 140

Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln
145 150 155 160

Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn
165 170 175

10

ES 2 385 712 T3

Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His
 180 185 190
 Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile
 195 200 205
 Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys
 210 215 220
 Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys
 225 230 235 240
 Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile
 245 250 255
 Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr
 260 265 270
 Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile
 290 295 300
 Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu
 325 330 335
 Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu
 340 345 350
 Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr
 370 375 380
 Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro
 385 390 395 400
 Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn
 405 410 415
 Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala
 420 425 430
 Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu
 435 440 445
 Lys Asn Glu Gln
 450

<210> 7

<211> 1128

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 385 712 T3

<220>

<223> OB RGRP YFP

<220>

<221> característica_misc

5 <223> OB RGRP YFP

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1128)

<223>

10 <400> 7

atg gcg ggc gtt aaa gct ctc gtg gca tta tcc ttc agt ggg gct att	48
Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile	
1 5 10 15	
gga ctg act ttt ctt atg ctg gga tgt gcc tta gag gat tat ggc gtt	96
Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val	
20 25 30	
tac tgg ccc tta ttc gtc ctg att ttc cac gcc atc tcc ccc atc ccc	144
Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro	
35 40 45	
cat ttc att gcc aaa aga gtc acc tat gac tca gat gca acc agt agt	192
His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser	
50 55 60	
gcc tgt cgg gaa ctg gca tat ttc ttc act act gga att gtt gtt tct	240
Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser	
65 70 75 80	
gcc ttt gga ttt cct gtt att ctt gct cgt gtg gct gtg atc aaa tgg	288
Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp	
85 90 95	
gga gcc tgc ggc ctt gtg ttg gca ggc aat gca gtc att ttc ctt aca	336
Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr	
100 105 110	
att caa ggg ttt ttc ctt ata ttt gga aga gga gat gat ttt agc tgg	384

ES 2 385 712 T3

Ile	Gln	Gly	Phe	Phe	Leu	Ile	Phe	Gly	Arg	Gly	Asp	Asp	Phe	Ser	Trp	
		115					120					125				
gag	cag	tgg	att	ccg	gtc	gcc	acc	atg	gtg	agc	aag	ggc	gag	gag	ctg	432
Glu	Gln	Trp	Ile	Pro	Val	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	
		130				135					140					
ttc	acc	ggg	gtg	gtg	ccc	atc	ctg	gtc	gag	ctg	gac	ggc	gac	gta	aac	480
Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	
		145			150				155						160	
ggc	cac	aag	ttc	agc	gtg	tcc	ggc	gag	ggc	gag	ggc	gat	gcc	acc	tac	528
Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	
				165				170						175		
ggc	aag	ctg	acc	ctg	aag	ttc	atc	tgc	acc	acc	ggc	aag	ctg	ccc	gtg	576
Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	
			180					185					190			
ccc	tgg	ccc	acc	ctc	gtg	acc	acc	ttc	ggc	tac	ggc	gtg	cag	tgc	ttc	624
Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	
		195					200					205				
gcc	cgc	tac	ccc	gac	cac	atg	cgc	cag	cac	gac	ttc	ttc	aag	tcc	gcc	672
Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Arg	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	
		210				215					220					
atg	ccc	gaa	ggc	tac	gtc	cag	gag	cgc	acc	atc	ttc	ttc	aag	gac	gac	720
Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	
		225			230					235					240	
ggc	aac	tac	aag	acc	cgc	gcc	gag	gtg	aag	ttc	gag	ggc	gac	acc	ctg	768
Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	
				245					250					255		
gtg	aac	cgc	atc	gag	ctg	aag	ggc	atc	gac	ttc	aag	gag	gac	ggc	aac	816
Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	
			260					265					270			
atc	ctg	ggg	cac	aag	ctg	gag	tac	aac	tac	aac	agc	cac	aac	gtc	tat	864
Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	
		275				280						285				
atc	atg	gcc	gac	aag	cag	aag	aac	ggc	atc	aag	gtg	aac	ttc	aag	atc	912
Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	
		290				295					300					
cgc	cac	aac	atc	gag	gac	ggc	agc	gtg	cag	ctc	gcc	gac	cac	tac	cag	960
Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	
		305			310				315						320	
cag	aac	acc	ccc	atc	ggc	gac	ggc	ccc	gtg	ctg	ctg	ccc	gac	aac	cac	1008
Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	
				325					330					335		
tac	ctg	agc	tac	cag	tcc	gcc	ctg	agc	aaa	gac	ccc	aac	gag	aag	cgc	1056
Tyr	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	
			340					345					350			
gat	cac	atg	gtc	ctg	ctg	gag	ttc	gtg	acc	gcc	gcc	ggg	atc	act	ctc	1104
Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	
		355				360						365				
ggc	atg	gac	gag	ctg	tac	aag	taa									1128
Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys										
		370				375										

<210> 8

<211> 375

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> OB RGRP YFP

<220>

<221> característica_misc

10 <223> OB RGRP YFP

<400> 8

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

ES 2 385 712 T3

Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe
195 200 205

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

Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
225 230 235 240

Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
245 250 255

Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
260 265 270

Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
275 280 285

Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
290 295 300

Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
305 310 315 320

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
325 330 335

Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
340 345 350

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
355 360 365

Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
370 375

<210> 9

<211> 2691

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2691)

<223>

10 <400> 9

ES 2 385 712 T3

atg Met 1	att Ile	tgt Cys	caa Gln	aaa Lys 5	ttc Phe	tgt Cys	gtg Val	ggt Val	ttg Leu 10	tta Leu	cat His	tgg Trp	gaa Glu	ttt Phe 15	att Ile	48
tat Tyr	gtg Val	ata Ile	act Thr 20	gcg Ala	ttt Phe	aac Asn	ttg Leu	tca Ser 25	tat Tyr	cca Pro	att Ile	act Thr	cct Pro 30	tgg Trp	aga Arg	96
ttt Phe	aag Lys	ttg Leu 35	tct Ser	tgc Cys	atg Met	cca Pro	cca Pro 40	aat Asn	tca Ser	acc Thr	tat Tyr	gac Asp 45	tac Tyr	ttc Phe	ctt Leu	144
ttg Leu	cct Pro 50	gct Ala	gga Gly	ctc Leu	tca Ser	aag Lys 55	aat Asn	act Thr	tca Ser	aat Asn	tgc Ser 60	aat Asn	gga Gly	cat His	tat Tyr	192
gag Glu 65	aca Thr	gct Ala	ggt Val	gaa Glu	cct Pro 70	aag Lys	ttt Phe	aat Asn	tca Ser	agt Ser 75	ggt Gly	act Thr	cac His	ttt Phe	tct Ser 80	240
aac Asn	tta Leu	tcc Ser	aaa Lys	aca Thr 85	act Thr	ttc Phe	cac His	tgt Cys	tgc Cys 90	ttt Phe	cgg Arg	agt Ser	gag Glu	caa Gln 95	gat Asp	288
aga Arg	aac Asn	tgc Cys	tcc Ser 100	tta Leu	tgt Cys	gca Ala	gac Asp	aac Asn 105	att Ile	gaa Glu	gga Gly	aag Lys	aca Thr 110	ttt Phe	gtt Val	336
tca Ser	aca Thr	gta Val 115	aat Asn	tct Ser	tta Leu	gtt Val	ttt Phe 120	caa Gln	caa Gln	ata Ile	gat Asp	gca Ala 125	aac Asn	tgg Trp	aac Asn	384
ata Ile	cag Gln 130	tgc Cys	tgg Trp	cta Leu	aaa Lys	gga Gly 135	gac Asp	tta Leu	aaa Lys	tta Leu	ttc Phe 140	atc Ile	tgt Cys	tat Tyr	gtg Val	432
gag Glu 145	tca Ser	tta Leu	ttt Phe	aag Lys	aat Asn 150	cta Leu	ttc Phe	agg Arg	aat Asn 155	tat Tyr	aac Asn	tat Tyr	aag Lys	gtc Val	cat His 160	480
ctt Leu	tta Leu	tat Tyr	gtt Val	ctg Leu 165	cct Pro	gaa Glu	gtg Val	tta Leu	gaa Glu 170	gat Asp	tca Ser	cct Pro	ctg Leu	gtt Val 175	ccc Pro	528
caa Gln	aaa Lys	ggc Gly	agt Ser 180	ttt Phe	cag Gln	atg Met	gtt Val	cac His 185	tgc Cys	aat Asn	tgc Cys	agt Ser	gtt Val 190	cat His	gaa Glu	576
tgt Cys	tgt Cys	gaa Glu 195	tgt Cys	ctt Leu	gtg Val	cct Pro	gtg Val 200	cca Pro	aca Thr	gcc Ala	aaa Lys	ctc Leu 205	aac Asn	gac Asp	act Thr	624
ctc Leu	ctt Leu 210	atg Met	tgt Cys	ttg Leu	aaa Lys	atc Ile 215	aca Thr	tct Ser	ggg Gly	gga Gly	gta Val 220	att Ile	ttc Phe	cag Gln	tca Ser	672
cct Pro 225	cta Leu	atg Met	tca Ser	gtt Val	cag Gln 230	ccc Pro	ata Ile	aat Asn	atg Met	gtg Val 235	aag Lys	cct Pro	gat Asp	cca Pro	cca Pro 240	720
tta Leu	ggg Gly	ttg Leu	cat His	atg Met 245	gaa Glu	atc Ile	aca Thr	gat Asp	gat Asp 250	ggg Gly	aat Asn	tta Leu	aag Lys	att Ile 255	tct Ser	768
tgg	tcc	agc	cca	cca	ttg	gta	cca	ttt	cca	ctt	caa	tat	caa	gtg	aaa	816

ES 2 385 712 T3

Trp	Ser	Ser	Pro 260	Pro	Leu	Val	Pro	Phe 265	Pro	Leu	Gln	Tyr	Gln 270	Val	Lys	
tat Tyr	tca Ser	gag Glu 275	aat Asn	tct Ser	aca Thr	aca Thr	gtt Val 280	atc Ile	aga Arg	gaa Glu	gct Ala 285	gac Asp	aag Lys	att Ile	gtc Val	864
tca Ser	gct Ala 290	aca Thr	tcc Ser	ctg Leu	cta Leu	gta Val 295	gac Asp	agt Ser	ata Ile	ctt Leu	cct Pro 300	ggg Gly	tct Ser	tcg Ser	tat Tyr	912
gag Glu 305	ggt Val	cag Gln	gtg Val	agg Arg	ggc Gly 310	aag Lys	aga Arg	ctg Leu	gat Asp	ggc Gly 315	cca Pro	gga Gly	atc Ile	tgg Trp	agt Ser 320	960
gac Asp	tgg Trp	agt Ser	act Thr	cct Pro 325	cgt Arg	gtc Val	ttt Phe	acc Thr	aca Thr 330	caa Gln	gat Asp	gtc Val	ata Ile	tac Tyr 335	ttt Phe	1008
cca Pro	cct Pro	aaa Lys	att Ile 340	ctg Leu	aca Thr	agt Ser	ggt Val	ggg Gly 345	tct Ser	aat Asn	ggt Val	tct Ser	ttt Phe 350	cac His	tgc Cys	1056
atc Ile	tat Tyr	aag Lys 355	aag Lys	gaa Glu	aac Asn	aag Lys	att Ile 360	ggt Val	ccc Pro	tca Ser	aaa Lys	gag Glu 365	att Ile	ggt Val	tgg Trp	1104
tgg Trp	atg Met 370	aat Asn	tta Leu	gct Ala	gag Glu	aaa Lys 375	att Ile	cct Pro	caa Gln	agc Ser	cag Gln 380	tat Tyr	gat Asp	ggt Val	gtg Val	1152
agt Ser 385	gat Asp	cat His	ggt Val	agc Ser	aaa Lys 390	ggt Val	act Thr	ttt Phe	ttc Phe	aat Asn 395	ctg Leu	aat Asn	gaa Glu	acc Thr	aaa Lys 400	1200
cct Pro	cga Arg	gga Gly	aag Lys	ttt Phe 405	acc Thr	tat Tyr	gat Asp	gca Ala 410	gtg Val	tac Tyr	tgc Cys	tgc Cys	aat Asn	gaa Glu 415	cat His	1248
gaa Glu	tgc Cys	cat His	cat His 420	cgc Arg	tat Tyr	gct Ala	gaa Glu	tta Leu 425	tat Tyr	gtg Val	att Ile	gat Asp 430	gtc Val	aat Asn	atc Ile	1296
aat Asn	atc Ile	tca Ser 435	tgt Cys	gaa Glu	act Thr	gat Asp	ggg Gly 440	tac Tyr	tta Leu	act Thr	aaa Lys	atg Met 445	act Thr	tgc Cys	aga Arg	1344
tgg Trp	tca Ser 450	acc Thr	agt Ser	aca Thr	atc Ile	cag Gln 455	tca Ser	ctt Leu	gcg Ala	gaa Glu	agc Ser 460	act Thr	ttg Leu	caa Gln	ttg Leu	1392
agg Arg 465	tat Tyr	cat His	agg Arg	agc Ser	agc Ser 470	ctt Leu	tac Tyr	tgt Cys	tct Ser	gat Asp 475	att Ile	cca Pro	tct Ser	att Ile	cat His 480	1440
ccc Pro	ata Ile	tct Ser	gag Glu	ccc Pro 485	aaa Lys	gat Asp	tgc Cys	tat Tyr	ttg Leu 490	cag Gln	agt Ser	gat Asp	ggt Gly	ttt Phe 495	tat Tyr	1488
gaa Glu	tgc Cys	att Ile	ttc Phe 500	cag Gln	cca Pro	atc Ile	ttc Phe	cta Leu 505	tta Leu	tct Ser	ggc Gly	tac Tyr	aca Thr 510	atg Met	tgg Trp	1536
att Ile	agg Arg	atc Ile 515	aat Asn	cac His	tct Ser	cta Leu	ggt Gly 520	tca Ser	ctt Leu	gac Asp	tct Ser	cca Pro 525	cca Pro	aca Thr	tgt Cys	1584
gtc	ctt	cct	gat	tct	gtg	gtg	aag	cca	ctg	cct	cca	tcc	agt	gtg	aaa	1632

ES 2 385 712 T3

Val 530	Leu	Pro	Asp	Ser	Val 535	Val 535	Lys	Pro	Leu	Pro	Pro 540	Ser	Ser	Val	Lys	
gca Ala 545	gaa Glu	att Ile	act Thr	ata Ile	aac Asn 550	att Ile	gga Gly	tta Leu	ttg Leu	aaa Lys 555	ata Ile	tct Ser	tgg Trp	gaa Glu	aag Lys 560	1680
cca Pro	gtc Val	ttt Phe	cca Pro	gag Glu 565	aat Asn	aac Asn	ctt Leu	caa Gln	ttc Phe 570	cag Gln	att Ile	cgc Arg	tat Tyr	ggt Gly 575	tta Leu	1728
agt Ser	gga Gly	aaa Lys	gaa Glu 580	gta Val	caa Gln	tgg Trp	aag Lys	atg Met 585	tat Tyr	gag Glu	gtt Val	tat Tyr	gat Asp 590	gca Ala	aaa Lys	1776
tca Ser	aaa Lys	tct Ser 595	gtc Val	agt Ser	ctc Leu	cca Pro	gtt Val 600	cca Pro	gac Asp	ttg Leu	tgt Cys	gca Ala 605	gtc Val	tat Tyr	gct Ala	1824
gtt Val	cag Gln 610	gtg Val	cgc Arg	tgt Cys	aag Lys	agg Arg 615	cta Leu	gat Asp	gga Gly	ctg Leu	gga Gly 620	tat Tyr	tgg Trp	agt Ser	aat Asn	1872
tgg Trp 625	agc Ser	aat Asn	cca Pro	gcc Ala	tac Tyr 630	aca Thr	gtt Val	gtc Val	atg Met	gat Asp 635	ata Ile	aaa Lys	gtt Val	cct Pro	atg Met 640	1920
aga Arg	gga Gly	cct Pro	gaa Glu	ttt Phe 645	tgg Trp	aga Arg	ata Ile	att Ile	aat Asn 650	gga Gly	gat Asp	act Thr	atg Met	aaa Lys 655	aag Lys	1968
gag Glu	aaa Lys	aat Asn	gtc Val 660	act Thr	tta Leu	ctt Leu	tgg Trp	aag Lys 665	ccc Pro	ctg Leu	atg Met	aaa Lys	aat Asn 670	gac Asp	tca Ser	2016
ttg Leu	tgc Cys	agt Ser 675	gtt Val	cag Gln	aga Arg	tat Tyr	gtg Val 680	ata Ile	aac Asn	cat His	cat His	act Thr 685	tcc Ser	tgc Cys	aat Asn	2064
gga Gly	aca Thr 690	tgg Trp	tca Ser	gaa Glu	gat Asp	gtg Val 695	gga Gly	aat Asn	cac His	acg Thr	aaa Lys 700	ttc Phe	act Thr	ttc Phe	ctg Leu	2112
tgg Trp 705	aca Thr	gag Glu	caa Gln	gca Ala	cat His 710	act Thr	gtt Val	acg Thr	gtt Val	ctg Leu 715	gcc Ala	atc Ile	aat Asn	tca Ser	att Ile 720	2160
ggt Gly	gct Ala	tct Ser	gtt Val	gca Ala 725	aat Asn	ttt Phe	aat Asn	tta Leu	acc Thr 730	ttt Phe	tca Ser	tgg Trp	cct Pro	atg Met 735	agc Ser	2208
aaa Lys	gta Val	aat Asn	atc Ile 740	gtg Val	cag Gln	tca Ser	ctc Leu	agt Ser 745	gct Ala	tat Tyr	cct Pro	tta Leu	aac Asn 750	agc Ser	agt Ser	2256
tgt Cys	gtg Val	att Ile 755	gtt Val	tcc Ser	tgg Trp	ata Ile	cta Leu 760	tca Ser	ccc Pro	agt Ser	gat Asp	tac Tyr 765	aag Lys	cta Leu	atg Met	2304
tat Tyr	ttt Phe 770	att Ile	att Ile	gag Glu	tgg Trp	aaa Lys 775	aat Asn	ctt Leu	aat Asn	gaa Glu	gat Asp 780	ggt Gly	gaa Glu	ata Ile	aaa Lys	2352
tgg Trp 785	ctt Leu	aga Arg	atc Ile	tct Ser	tca Ser 790	tct Ser	gtt Val	aag Lys	aag Lys	tat Tyr 795	tat Tyr	atc Ile	cat His	gat Asp	cat His 800	2400
ttt atc	ccc	att	gag	aag	tac	cag	ttc	agt	ctt	tac	cca	ata	ttt	atg		2448

ES 2 385 712 T3

Phe	Ile	Pro	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gln	Phe	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ile	Phe	Met	
				805					810					815		
gaa	gga	gtg	gga	aaa	cca	aag	ata	att	aat	agt	ttc	act	caa	gat	gat	2496
Glu	Gly	Val	Gly	Lys	Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Ser	Phe	Thr	Gln	Asp	Asp	
			820					825					830			
att	gaa	aaa	cac	cag	agt	gat	gca	ggg	tta	tat	gta	att	gtg	cca	gta	2544
Ile	Glu	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Val	Ile	Val	Pro	Val	
		835					840					845				
att	att	tcc	tct	tcc	atc	tta	ttg	ctt	gga	aca	tta	tta	ata	tca	cac	2592
Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Ile	Ser	His	
	850					855					860					
caa	aga	atg	aaa	aag	cta	ttt	tgg	gaa	gat	gtt	ccg	aac	ccc	aag	aat	2640
Gln	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Phe	Trp	Glu	Asp	Val	Pro	Asn	Pro	Lys	Asn	
865					870					875					880	
tgt	tcc	tgg	gca	caa	gga	ctt	aat	ttt	cag	aag	aga	acg	gac	att	ctt	2688
Cys	Ser	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Lys	Arg	Thr	Asp	Ile	Leu	
				885					890					895		
tga																2691

<210> 10

<211> 896

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val
130 135 140

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His
145 150 155 160

Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro
165 170 175

Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu
180 185 190

Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr
195 200 205

Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser
210 215 220

Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro
225 230 235 240

Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser
245 250 255

Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys
260 265 270

Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val
275 280 285

Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr
290 295 300

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

Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe
325 330 335

Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys
340 345 350

Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp
355 360 365

Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val
370 375 380

Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys
385 390 395 400

ES 2 385 712 T3

Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His
 405 410 415
 Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile
 420 425 430
 Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg
 435 440 445
 Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu
 450 455 460
 Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His
 465 470 475 480
 Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr
 485 490 495
 Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp
 500 505 510
 Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys
 515 520 525
 Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys
 530 535 540
 Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys
 545 550 555 560
 Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu
 565 570 575
 Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys
 580 585 590
 Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala
 595 600 605
 Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn
 610 615 620
 Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met
 625 630 635 640
 Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys
 645 650 655
 Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser
 660 665 670

ES 2 385 712 T3

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

<210> 11

<211> 3705

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> OBR LUC

<220>

<221> característica_misc

10 <223> OBR LUC

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3705)

<223>

15 <400> 11

ES 2 385 712 T3

atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu 1 5 10 15	48
ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cgc Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg 20 25 30	96
cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile 35 40 45	144
act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat Thr Pro Trp Arg Phe Lys Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr 50 55 60	192
gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser 65 70 75 80	240
aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly 85 90 95	288
act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg 100 105 110	336
agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly 115 120 125	384
acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp 130 135 140	432
gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe 145 150 155 160	480
atc tgt tat gtg gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn 165 170 175	528
tat aag gtc cat ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca	576

ES 2 385 712 T3

Tyr	Lys	Val	His 180	Leu	Leu	Tyr	Val	Leu 185	Pro	Glu	Val	Leu	Glu 190	Asp	Ser		
cct	ctg	ggt	ccc	caa	aaa	ggc	agt	ttt	cag	atg	ggt	cac	tgc	aat	tgc	624	
Pro	Leu	Val 195	Pro	Gln	Lys	Gly	Ser 200	Phe	Gln	Met	Val	His 205	Cys	Asn	Cys		
agt	ggt	cat	gaa	tgt	tgt	gaa	tgt	ctt	gtg	cct	gtg	cca	aca	gcc	aaa	672	
Ser	Val 210	His	Glu	Cys	Cys	Glu 215	Cys	Leu	Val	Pro	Val 220	Pro	Thr	Ala	Lys		
ctc	aac	gac	act	ctc	ctt	atg	tgt	ttg	aaa	atc	aca	tct	ggt	gga	gta	720	
Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Leu 230	Met	Cys	Leu	Lys	Ile 235	Thr	Ser	Gly	Gly	Val 240		
att	ttc	cgg	tca	cct	cta	atg	tca	ggt	cag	ccc	ata	aat	atg	gtg	aag	768	
Ile	Phe	Arg	Ser	Pro 245	Leu	Met	Ser	Val	Gln 250	Pro	Ile	Asn	Met	Val 255	Lys		
cct	gat	cca	cca	tta	ggt	ttg	cat	atg	gaa	atc	aca	gat	gat	ggt	aat	816	
Pro	Asp	Pro	Pro 260	Leu	Gly	Leu	His	Met 265	Glu	Ile	Thr	Asp	Asp 270	Gly	Asn		
tta	aag	att	tct	tgg	tcc	agc	cca	cca	ttg	gta	cca	ttt	cca	ctt	caa	864	
Leu	Lys	Ile 275	Ser	Trp	Ser	Ser	Pro 280	Pro	Leu	Val	Pro	Phe 285	Pro	Leu	Gln		
tat	caa	gtg	aaa	tat	tca	gag	aat	tct	aca	aca	ggt	atc	aga	gaa	gct	912	
Tyr	Gln 290	Val	Lys	Tyr	Ser	Glu 295	Asn	Ser	Thr	Thr	Val 300	Ile	Arg	Glu	Ala		
gac	aag	att	gtc	tca	gct	aca	tcc	ctg	cta	gta	gac	agt	ata	ctt	cct	960	
Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Ala 310	Thr	Ser	Leu	Leu	Val 315	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro 320		
ggg	tct	tcg	tat	gag	ggt	cag	gtg	agg	ggc	aag	aga	ctg	gat	ggc	cca	1008	
Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu 325	Val	Gln	Val	Arg	Gly 330	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly 335	Pro		
gga	atc	tgg	agt	gac	tgg	agt	act	cct	cgt	gtc	ttt	acc	aca	caa	gat	1056	
Gly	Ile	Trp	Ser 340	Asp	Trp	Ser	Thr	Pro 345	Arg	Val	Phe	Thr 350	Thr	Gln	Asp		
gtc	ata	tac	ttt	cca	cct	aaa	att	ctg	aca	agt	ggt	ggg	tct	aat	ggt	1104	
Val	Ile	Tyr 355	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile 360	Leu	Thr	Ser	Val	Gly 365	Ser	Asn	Val		
tct	ttt	cac	tgc	atc	tat	aag	aag	gaa	aac	aag	att	ggt	ccc	tca	aaa	1152	
Ser	Phe 370	His	Cys	Ile	Tyr	Lys 375	Lys	Glu	Asn	Lys	Ile 380	Val	Pro	Ser	Lys		
gag	att	ggt	tgg	tgg	atg	aat	tta	gct	gag	aaa	att	cct	caa	agc	cag	1200	
Glu	Ile	Val	Trp	Trp	Met 390	Asn	Leu	Ala	Glu	Lys 395	Ile	Pro	Gln	Ser	Gln 400		
tat	gat	ggt	gtg	agt	gat	cat	ggt	agc	aaa	ggt	act	ttt	ttc	aat	ctg	1248	
Tyr	Asp	Val	Val	Ser 405	Asp	His	Val	Ser	Lys 410	Val	Thr	Phe	Phe 415	Asn	Leu		
aat	gaa	acc	aaa	cct	cga	gga	aag	ttt	acc	tat	gat	gca	gtg	tac	tgc	1296	
Asn	Glu	Thr	Lys 420	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe 425	Thr	Tyr	Asp	Ala	Val 430	Tyr	Cys		
tgc	aat	gaa	cat	gaa	tgc	cat	cat	cgc	tat	gct	gaa	tta	tat	gtg	att	1344	
Cys	Asn	Glu 435	His	Glu	Cys	His	His 440	Arg	Tyr	Ala	Glu	Leu 445	Tyr	Val	Ile		
gat	gtc	aat	atc	aat	atc	tca	tgt	gaa	act	gat	ggg	tac	tta	act	aaa	1392	

ES 2 385 712 T3

Asp 450	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser 455	Cys	Glu	Thr	Asp	Gly 460	Tyr	Leu	Thr	Lys	
atg Met 465	act Thr	tgc Cys	aga Arg	tgg Trp	tca Ser 470	acc Thr	agt Ser	aca Thr	atc Ile	cag Gln 475	tca Ser	ctt Leu	gcg Ala	gaa Glu	agc Ser 480	1440
act Thr	ttg Leu	caa Gln	ttg Leu	agg Arg 485	tat Tyr	cat His	agg Arg	agc Ser	agc Ser 490	ctt Leu	tac Tyr	tgt Cys	tct Ser	gat Asp 495	att Ile	1488
cca Pro	tct Ser	att Ile	cat His 500	ccc Pro	ata Ile	tct Ser	gag Glu	ccc Pro 505	aaa Lys	gat Asp	tgc Cys	tat Tyr	ttg Leu 510	cag Gln	agt Ser	1536
gat Asp	ggg Gly	ttt Phe 515	tat Tyr	gaa Glu	tgc Cys	att Ile	ttc Phe 520	cag Gln	cca Pro	atc Ile	ttc Phe 525	cta Leu	tta Leu	tct Ser	ggc Gly	1584
tac Tyr 530	aca Thr	atg Met	tgg Trp	att Ile	agg Arg	atc Ile 535	aat Asn	cac His	tct Ser	cta Leu	ggg Gly 540	tca Ser	ctt Leu	gac Asp	tct Ser	1632
cca Pro 545	cca Pro	aca Thr	tgt Cys	gtc Val	ctt Leu 550	cct Pro	gat Asp	tct Ser	gtg Val	gtg Val 555	aag Lys	cca Pro	ctg Leu	cct Pro	cca Pro 560	1680
tcc Ser	agt Ser	gtg Val	aaa Lys	gca Ala 565	gaa Glu	att Ile	act Thr	ata Ile	aac Asn 570	att Ile	gga Gly	tta Leu	ttg Leu	aaa Lys 575	ata Ile	1728
tct Ser	tgg Trp	gaa Glu	aag Lys 580	cca Pro	gtc Val	ttt Phe	cca Pro	gag Glu 585	aat Asn	aac Asn	ctt Leu	caa Gln	ttc Phe 590	cag Gln	att Ile	1776
cgc Arg	tat Tyr	ggg Gly 595	tta Leu	agt Ser	gga Gly	aaa Lys	gaa Glu 600	gta Val	caa Gln	tgg Trp	aag Lys	atg Met 605	tat Tyr	gag Glu	gtt Val	1824
tat Tyr 610	gat Asp	gca Ala	aaa Lys	tca Ser	aaa Lys	tct Ser 615	gtc Val	agt Ser	ctc Leu	cca Pro	gtt Val 620	cca Pro	gac Asp	ttg Leu	tgt Cys	1872
gca Ala 625	gtc Val	tat Tyr	gct Ala	gtt Val	cag Gln 630	gtg Val	cgc Arg	tgt Cys	aag Lys	agg Arg 635	cta Leu	gat Asp	gga Gly	ctg Leu	gga Gly 640	1920
tat Tyr	tgg Trp	agt Ser	aat Asn	tgg Trp 645	agc Ser	aat Asn	cca Pro	gcc Ala	tac Tyr 650	aca Thr	gtt Val	gtc Val	atg Met	gat Asp 655	ata Ile	1968
aaa Lys	gtt Val	cct Pro	atg Met 660	aga Arg	gga Gly	cct Pro	gaa Glu	ttt Phe 665	tgg Trp	aga Arg	ata Ile	att Ile	aat Asn 670	gga Gly	gat Asp	2016
act Thr	atg Met	aaa Lys 675	aag Lys	gag Glu	aaa Lys	aat Asn	gtc Val 680	act Thr	tta Leu	ctt Leu	tgg Trp 685	aag Lys	ccc Pro	ctg Leu	atg Met	2064
aaa Lys	aat Asn 690	gac Asp	tca Ser	ttg Leu	tgc Cys	agt Ser 695	gtt Val	cag Gln	aga Arg	tat Tyr	gtg Val 700	ata Ile	aac Asn	cat His	cat His	2112
act Thr 705	tcc Ser	tgc Cys	aat Asn	gga Gly	aca Thr 710	tgg Trp	tca Ser	gaa Glu	gat Asp	gtg Val 715	gga Gly	aat Asn	cac His	acg Thr	aaa Lys 720	2160
ttc Act	act Ttc	ctg Ttg	aca Gag	caa Gca	cat Act	gtt Acg	ggt Gtt	ctg Gcc								2208

ES 2 385 712 T3

Phe	Thr	Phe	Leu	Trp	Thr	Glu	Gln	Ala	His	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Ala	
				725					730					735		
atc	aat	tca	att	ggt	gct	tct	gtt	gca	aat	ttt	aat	tta	acc	ttt	tca	2256
Ile	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser	
			740					745				750				
tgg	cct	atg	agc	aaa	gta	aat	atc	gtg	cag	tca	ctc	agt	gct	tat	cct	2304
Trp	Pro	Met	Ser	Lys	Val	Asn	Ile	Val	Gln	Ser	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro	
		755					760				765					
tta	aac	agc	agt	tgt	gtg	att	gtt	tcc	tgg	ata	cta	tca	ccc	agt	gat	2352
Leu	Asn	Ser	Ser	Cys	Val	Ile	Val	Ser	Trp	Ile	Leu	Ser	Pro	Ser	Asp	
	770					775					780					
tac	aag	cta	atg	tat	ttt	att	att	gag	tgg	aaa	aat	ctt	aat	gaa	gat	2400
Tyr	Lys	Leu	Met	Tyr	Phe	Ile	Ile	Glu	Trp	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Asp	
	785				790					795				800		
ggt	gaa	ata	aaa	tgg	ctt	aga	atc	tct	tca	tct	gtt	aag	aag	tat	tat	2448
Gly	Glu	Ile	Lys	Trp	Leu	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Tyr	
			805						810					815		
atc	cat	gat	cat	ttt	atc	ccc	att	gag	aag	tac	cag	ttc	agt	ctt	tac	2496
Ile	His	Asp	His	Phe	Ile	Pro	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gln	Phe	Ser	Leu	Tyr	
			820					825					830			
cca	ata	ttt	atg	gaa	gga	gtg	gga	aaa	cca	aag	ata	att	aat	agt	ttc	2544
Pro	Ile	Phe	Met	Glu	Gly	Val	Gly	Lys	Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Ser	Phe	
		835					840					845				
act	caa	gat	gat	att	gaa	aaa	cac	cag	agt	gat	gca	ggt	tta	tat	gta	2592
Thr	Gln	Asp	Asp	Ile	Glu	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Val	
	850					855					860					
att	gtg	cca	gta	att	att	tcc	tct	tcc	atc	tta	ttg	ctt	gga	aca	tta	2640
Ile	Val	Pro	Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	
	865			870						875					880	
tta	ata	tca	cac	caa	aga	atg	aaa	aag	cta	ttt	tgg	gaa	gat	gtt	ccg	2688
Leu	Ile	Ser	His	Gln	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Phe	Trp	Glu	Asp	Val	Pro	
			885						890					895		
aac	ccc	aag	aat	tgt	tcc	tgg	gca	caa	gga	ctt	aat	ttt	cag	aag	aga	2736
Asn	Pro	Lys	Asn	Cys	Ser	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Lys	Arg	
			900					905					910			
acg	gac	att	ctg	gat	cca	ccg	gct	aga	gcc	acc	atg	acc	agc	aag	gtg	2784
Thr	Asp	Ile	Leu	Asp	Pro	Pro	Ala	Arg	Ala	Thr	Met	Thr	Ser	Lys	Val	
		915					920					925				
tac	gac	ccc	gag	cag	agg	aag	agg	atg	atc	acc	ggc	ccc	cag	tgg	tgg	2832
Tyr	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Met	Ile	Thr	Gly	Pro	Gln	Trp	Trp	
	930					935					940					
gcc	agg	tgc	aag	cag	atg	aac	gtg	ctg	gac	agc	ttc	atc	aac	tac	tac	2880
Ala	Arg	Cys	Lys	Gln	Met	Asn	Val	Leu	Asp	Ser	Phe	Ile	Asn	Tyr	Tyr	
	945			950						955					960	
gac	agc	gag	aag	cac	gcc	gag	aac	gcc	gtg	atc	ttc	ctg	cac	ggc	aac	2928
Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn	Ala	Val	Ile	Phe	Leu	His	Gly	Asn	
			965						970					975		
gcc	gct	agc	agc	tac	ctg	tgg	agg	cac	gtg	gtg	ccc	cac	atc	gag	ccc	2976
Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Trp	Arg	His	Val	Val	Pro	His	Ile	Glu	Pro	
			980					985					990			
gtg	gcc	agg	tgc	atc	atc	ccc	gat	ctg	atc	ggc	atg	ggc	aag	agc	ggc	3024

ES 2 385 712 T3

Val	Ala	Arg	Cys	Ile	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Lys	Ser	Gly	
		995					1000					1005				
aag Lys	agc Ser 1010	ggc Gly	aac Asn	ggc Gly	agc Ser	tac Tyr 1015	agg Arg	ctg Leu	ctg Leu	gac Asp	cac His 1020	tac Tyr	aag Lys	tac Tyr		3069
ctg Leu	acc Thr 1025	gcc Ala	tgg Trp	ttc Phe	gag Glu	ctc Leu 1030	ctg Leu	aac Asn	ctg Leu	ccc Pro	aag Lys 1035	aag Lys	atc Ile	atc Ile		3114
ttc Phe	gtg Val 1040	ggc Gly	cac His	gac Asp	tgg Trp	ggc Gly 1045	gcc Ala	tgc Cys	ctg Leu	gcc Ala	ttc Phe 1050	cac His	tac Tyr	agc Ser		3159
tac Tyr	gag Glu 1055	cac His	cag Gln	gac Asp	aag Lys	atc Ile 1060	aag Lys	gcc Ala	atc Ile	gtg Val	cac His 1065	gcc Ala	gag Glu	agc Ser		3204
gtg Val	gtg Val 1070	gac Asp	gtg Val	atc Ile	gag Glu	agc Ser 1075	tgg Trp	gac Asp	gag Glu	tgg Trp	cca Pro 1080	gac Asp	atc Ile	gag Glu		3249
gag Glu	gac Asp 1085	atc Ile	gcc Ala	ctg Leu	atc Ile	aag Lys 1090	agc Ser	gag Glu	gag Glu	ggc Gly	gag Glu 1095	aag Lys	atg Met	gtg Val		3294
ctg Leu	gag Glu 1100	aac Asn	aac Asn	ttc Phe	ttc Phe	gtg Val 1105	gag Glu	acc Thr	atg Met	ctg Leu	ccc Pro 1110	agc Ser	aag Lys	atc Ile		3339
atg Met	aga Arg 1115	aag Lys	ctg Leu	gag Glu	ccc Pro	gag Glu 1120	gag Glu	ttc Phe	gcc Ala	gcc Ala	tac Tyr 1125	ctg Leu	gag Glu	ccc Pro		3384
ttc Phe	aag Lys 1130	gag Glu	aag Lys	ggc Gly	gag Glu	gtg Val 1135	aga Arg	aga Arg	ccc Pro	acc Thr	ctg Leu 1140	agc Ser	tgg Trp	ccc Pro		3429
aga Arg	gag Glu 1145	atc Ile	ccc Pro	ctg Leu	gtg Val	aag Lys 1150	ggc Gly	ggc Gly	aag Lys	ccc Pro	gac Asp 1155	gtg Val	gtg Val	cag Gln		3474
atc Ile	gtg Val 1160	aga Arg	aac Asn	tac Tyr	aac Asn	gcc Ala 1165	tac Tyr	ctg Leu	aga Arg	gcc Ala	agc Ser 1170	gac Asp	gac Asp	ctg Leu		3519
ccc Pro	aag Lys 1175	atg Met	ttc Phe	atc Ile	gag Glu	agc Ser 1180	gac Asp	ccc Pro	ggc Gly	ttc Phe	ttc Phe 1185	agc Ser	aac Asn	gcc Ala		3564
atc Ile	gtg Val 1190	gag Glu	ggc Gly	gcc Ala	aag Lys	aag Lys 1195	ttc Phe	ccc Pro	aac Asn	acc Thr	gag Glu 1200	ttc Phe	gtg Val	aag Lys		3609
gtg Val	aag Lys 1205	ggc Gly	ctg Leu	cac His	ttc Phe	agc Ser 1210	cag Gln	gag Glu	gac Asp	gcc Ala	ccc Pro 1215	gac Asp	gag Glu	atg Met		3654
ggc Gly	aag Lys 1220	tac Tyr	atc Ile	aag Lys	agc Ser	ttc Phe 1225	gtg Val	gag Glu	aga Arg	gtg Val	ctg Leu 1230	aag Lys	aac Asn	gag Glu		3699
cag Gln	taa															3705

<210> 12

<211> 1234

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> OBR LUC

<220>

<221> característica_misc

5 <223> OBR LUC

<400> 12

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
20 25 30

Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
35 40 45

Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
50 55 60

Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
65 70 75 80

Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
85 90 95

Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
100 105 110

Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
115 120 125

Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
130 135 140

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

Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
165 170 175

Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser
180 185 190

ES 2 385 712 T3

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

ES 2 385 712 T3

Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser
 465 470 475 480
 Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile
 485 490 495
 Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser
 500 505 510
 Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
 515 520 525
 Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
 530 535 540
 Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
 545 550 555 560
 Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
 565 570 575
 Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
 580 585 590
 Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
 595 600 605
 Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
 610 615 620
 Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
 625 630 635 640
 Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
 645 650 655
 Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
 660 665 670
 Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
 675 680 685
 Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
 690 695 700
 Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
 705 710 715 720
 Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
 725 730 735

ES 2 385 712 T3

Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
 740 745 750
 Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
 755 760 765
 Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
 770 775 780
 Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
 785 790 795 800
 Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
 805 810 815
 Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
 820 825 830
 Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
 835 840 845
 Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
 850 855 860
 Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
 865 870 875 880
 Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
 885 890 895
 Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
 900 905 910
 Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser Lys Val
 915 920 925
 Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp
 930 935 940
 Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr
 945 950 955 960
 Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn
 965 970 975
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro
 980 985 990
 Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly
 995 1000 1005

Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr
 1010 1015 1020
 Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile
 1025 1030 1035
 Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser
 1040 1045 1050
 Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser
 1055 1060 1065
 Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
 1070 1075 1080
 Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val
 1085 1090 1095
 Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile
 1100 1105 1110
 Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro
 1115 1120 1125
 Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro
 1130 1135 1140
 Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln
 1145 1150 1155
 Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu
 1160 1165 1170
 Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala
 1175 1180 1185
 Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys
 1190 1195 1200
 Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met
 1205 1210 1215
 Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu
 1220 1225 1230

Gln

<210> 13
 <211> 3486

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> OBR YFP

5 <220>
<221> característica_misc
<223> OBR YFP

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(3486)
<223>

<400> 13

atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg	48
Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cgc	96
Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg	
20 25 30	
cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att	144
Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile	
35 40 45	
act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat	192
Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr	
50 55 60	
gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg	240
Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser	
65 70 75 80	
aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt	288
Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly	
85 90 95	
act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg	336
Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg	
100 105 110	
agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga	384
Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly	
115 120 125	
acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat	432
Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp	
130 135 140	
gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc	480

ES 2 385 712 T3

Ala 145	Asn	Trp	Asn	Ile 150	Gln 150	Cys	Trp	Leu	Lys	Gly 155	Asp	Leu	Lys	Leu	Phe 160	
atc Ile	tgt Cys	tat Tyr	gtg Val	gag Glu 165	tca Ser	tta Leu	ttt Phe	aag Lys	aat Asn 170	cta Leu	ttc Phe	agg Arg	aat Asn	tat Tyr 175	aac Asn	528
tat Tyr	aag Lys	gtc Val	cat His 180	ctt Leu	tta Leu	tat Tyr	gtt Val	ctg Leu 185	cct Pro	gaa Glu	gtg Val	tta Leu	gaa Glu 190	gat Asp	tca Ser	576
cct Pro	ctg Leu	gtt Val 195	ccc Pro	caa Gln	aaa Lys	ggc Gly	agt Ser 200	ttt Phe	cag Gln	atg Met	gtt Val	cac His 205	tgc Cys	aat Asn	tgc Cys	624
agt Ser	gtt Val 210	cat His	gaa Glu	tgt Cys	tgt Cys	gaa Glu 215	tgt Cys	ctt Leu	gtg Val	cct Pro	gtg Val 220	cca Pro	aca Thr	gcc Ala	aaa Lys	672
ctc Leu 225	aac Asn	gac Asp	act Thr	ctc Leu	ctt Leu 230	atg Met	tgt Cys	ttg Leu	aaa Lys	atc Ile 235	aca Thr	tct Ser	ggg Gly	gga Gly	gta Val 240	720
att Ile	ttc Phe	cgg Arg	tca Ser	cct Pro 245	cta Leu	atg Met	tca Ser	gtt Val	cag Gln 250	ccc Pro	ata Ile	aat Asn	atg Met	gtg Val 255	aag Lys	768
cct Pro	gat Asp	cca Pro	cca Pro 260	tta Leu	ggg Gly	ttg Leu	cat His	atg Met 265	gaa Glu	atc Ile	aca Thr	gat Asp	gat Asp 270	ggg Gly	aat Asn	816
tta Leu	aag Lys	att Ile 275	tct Ser	tgg Trp	tcc Ser	agc Ser	cca Pro 280	cca Pro	ttg Leu	gta Val	cca Pro	ttt Phe 285	cca Pro	ctt Leu	caa Gln	864
tat Tyr	caa Gln 290	gtg Val	aaa Lys	tat Tyr	tca Ser	gag Glu 295	aat Asn	tct Ser	aca Thr	aca Thr	gtt Val 300	atc Ile	aga Arg	gaa Glu	gct Ala	912
gac Asp 305	aag Lys	att Ile	gtc Val	tca Ser	gct Ala 310	aca Thr	tcc Ser	ctg Leu	cta Leu	gta Val 315	gac Asp	agt Ser	ata Ile	ctt Leu	cct Pro 320	960
ggg Gly	tct Ser	tcg Ser	tat Tyr	gag Glu 325	gtt Val	cag Gln	gtg Val	agg Arg	ggc Gly 330	aag Lys	aga Arg	ctg Leu	gat Asp	ggc Gly 335	cca Pro	1008
gga Gly	atc Ile	tgg Trp	agt Ser 340	gac Asp	tgg Trp	agt Ser	act Thr	cct Pro 345	cgt Arg	gtc Val	ttt Phe	acc Thr	aca Thr 350	caa Gln	gat Asp	1056
gtc Val	ata Ile	tac Tyr 355	ttt Phe	cca Pro	cct Pro	aaa Lys	att Ile 360	ctg Leu	aca Thr	agt Ser	gtt Val	ggg Gly 365	tct Ser	aat Asn	gtt Val	1104
tct Ser	ttt Phe 370	cac His	tgc Cys	atc Ile	tat Tyr	aag Lys 375	aag Lys	gaa Glu	aac Asn	aag Lys	att Ile 380	gtt Val	ccc Pro	tca Ser	aaa Lys	1152
gag Glu 385	att Ile	gtt Val	tgg Trp	tgg Trp	atg Met 390	aat Asn	tta Leu	gct Ala	gag Glu	aaa Lys 395	att Ile	cct Pro	caa Gln	agc Ser	cag Gln 400	1200
tat Tyr	gat Asp	gtt Val	gtg Val	agt Ser 405	gat Asp	cat His	gtt Val	agc Ser	aaa Lys 410	gtt Val	act Thr	ttt Phe	ttc Phe	aat Asn 415	ctg Leu	1248
aat	gaa	acc	aaa	cct	cga	gga	aag	ttt	acc	tat	gat	gca	gtg	tac	tgc	1296

ES 2 385 712 T3

Asn	Glu	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr	Asp	Ala	Val	Tyr	Cys	
			420					425					430			
tgc	aat	gaa	cat	gaa	tgc	cat	cat	cgc	tat	gct	gaa	tta	tat	gtg	att	1344
Cys	Asn	Glu	His	Glu	Cys	His	His	Arg	Tyr	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Ile	
		435					440				445					
gat	gtc	aat	atc	aat	atc	tca	tgt	gaa	act	gat	ggg	tac	tta	act	aaa	1392
Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr	Lys	
	450					455					460					
atg	act	tgc	aga	tgg	tca	acc	agt	aca	atc	cag	tca	ctt	gcg	gaa	agc	1440
Met	Thr	Cys	Arg	Trp	Ser	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Ser	Leu	Ala	Glu	Ser	
	465				470					475					480	
act	ttg	caa	ttg	agg	tat	cat	agg	agc	agc	ctt	tac	tgt	tct	gat	att	1488
Thr	Leu	Gln	Leu	Arg	Tyr	His	Arg	Ser	Ser	Leu	Tyr	Cys	Ser	Asp	Ile	
				485				490						495		
cca	tct	att	cat	ccc	ata	tct	gag	ccc	aaa	gat	tgc	tat	ttg	cag	agt	1536
Pro	Ser	Ile	His	Pro	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys	Asp	Cys	Tyr	Leu	Gln	Ser	
			500					505					510			
gat	ggc	ttt	tat	gaa	tgc	att	ttc	cag	cca	atc	ttc	cta	tta	tct	ggc	1584
Asp	Gly	Phe	Tyr	Glu	Cys	Ile	Phe	Gln	Pro	Ile	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	
		515					520					525				
tac	aca	atg	tgg	att	agg	atc	aat	cac	tct	cta	ggc	tca	ctt	gac	tct	1632
Tyr	Thr	Met	Trp	Ile	Arg	Ile	Asn	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	
	530					535					540					
cca	cca	aca	tgt	gtc	ctt	cct	gat	tct	gtg	gtg	aag	cca	ctg	cct	cca	1680
Pro	Pro	Thr	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Val	Lys	Pro	Leu	Pro	Pro	
	545				550					555					560	
tcc	agt	gtg	aaa	gca	gaa	att	act	ata	aac	att	gga	tta	ttg	aaa	ata	1728
Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Lys	Ile	
				565				570						575		
tct	tgg	gaa	aag	cca	gtc	ttt	cca	gag	aat	aac	ctt	caa	ttc	cag	att	1776
Ser	Trp	Glu	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Glu	Asn	Asn	Leu	Gln	Phe	Gln	Ile	
			580					585					590			
cgc	tat	ggc	tta	agt	gga	aaa	gaa	gta	caa	tgg	aag	atg	tat	gag	gtt	1824
Arg	Tyr	Gly	Leu	Ser	Gly	Lys	Glu	Val	Gln	Trp	Lys	Met	Tyr	Glu	Val	
		595					600					605				
tat	gat	gca	aaa	tca	aaa	tct	gtc	agt	ctc	cca	gtt	cca	gac	ttg	tgt	1872
Tyr	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Asp	Leu	Cys	
	610					615					620					
gca	gtc	tat	gct	gtt	cag	gtg	cgc	tgt	aag	agg	cta	gat	gga	ctg	gga	1920
Ala	Val	Tyr	Ala	Val	Gln	Val	Arg	Cys	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Gly	
				625		630				635					640	
tat	tgg	agt	aat	tgg	agc	aat	cca	gcc	tac	aca	gtt	gtc	atg	gat	ata	1968
Tyr	Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Asn	Pro	Ala	Tyr	Thr	Val	Val	Met	Asp	Ile	
				645				650					655			
aaa	gtt	cct	atg	aga	gga	cct	gaa	ttt	tgg	aga	ata	att	aat	gga	gat	2016
Lys	Val	Pro	Met	Arg	Gly	Pro	Glu	Phe	Trp	Arg	Ile	Ile	Asn	Gly	Asp	
			660					665					670			
act	atg	aaa	aag	gag	aaa	aat	gtc	act	tta	ctt	tgg	aag	ccc	ctg	atg	2064
Thr	Met	Lys	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Lys	Pro	Leu	Met	
		675					680					685				
aaa	aat	gac	tca	ttg	tgc	agt	gtt	cag	aga	tat	gtg	ata	aac	cat	cat	2112

ES 2 385 712 T3

Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Tyr	Val	Ile	Asn	His	His	
690	690					695					700					
act	tcc	tgc	aat	gga	aca	tgg	tca	gaa	gat	gtg	gga	aat	cac	acg	aaa	2160
Thr	Ser	Cys	Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Asp	Val	Gly	Asn	His	Thr	Lys	
705				710						715					720	
ttc	act	ttc	ctg	tgg	aca	gag	caa	gca	cat	act	gtt	acg	gtt	ctg	gcc	2208
Phe	Thr	Phe	Leu	Trp	Thr	Glu	Gln	Ala	His	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Ala	
				725					730					735		
atc	aat	tca	att	ggt	gct	tct	gtt	gca	aat	ttt	aat	tta	acc	ttt	tca	2256
Ile	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser	
				740				745					750			
tgg	cct	atg	agc	aaa	gta	aat	atc	gtg	cag	tca	ctc	agt	gct	tat	cct	2304
Trp	Pro	Met	Ser	Lys	Val	Asn	Ile	Val	Gln	Ser	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro	
		755					760					765				
tta	aac	agc	agt	tgt	gtg	att	gtt	tcc	tgg	ata	cta	tca	ccc	agt	gat	2352
Leu	Asn	Ser	Ser	Cys	Val	Ile	Val	Ser	Trp	Ile	Leu	Ser	Pro	Ser	Asp	
						775					780					
tac	aag	cta	atg	tat	ttt	att	att	gag	tgg	aaa	aat	ctt	aat	gaa	gat	2400
Tyr	Lys	Leu	Met	Tyr	Phe	Ile	Ile	Glu	Trp	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Asp	
					790					795					800	
ggt	gaa	ata	aaa	tgg	ctt	aga	atc	tct	tca	tct	gtt	aag	aag	tat	tat	2448
Gly	Glu	Ile	Lys	Trp	Leu	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Tyr	
				805					810					815		
atc	cat	gat	cat	ttt	atc	ccc	att	gag	aag	tac	cag	ttc	agt	ctt	tac	2496
Ile	His	Asp	His	Phe	Ile	Pro	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gln	Phe	Ser	Leu	Tyr	
				820				825					830			
cca	ata	ttt	atg	gaa	gga	gtg	gga	aaa	cca	aag	ata	att	aat	agt	ttc	2544
Pro	Ile	Phe	Met	Glu	Gly	Val	Gly	Lys	Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Ser	Phe	
				835			840					845				
act	caa	gat	gat	att	gaa	aaa	cac	cag	agt	gat	gca	ggt	tta	tat	gta	2592
Thr	Gln	Asp	Asp	Ile	Glu	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Val	
						855					860					
att	gtg	cca	gta	att	att	tcc	tct	tcc	atc	tta	ttg	ctt	gga	aca	tta	2640
Ile	Val	Pro	Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	
					870					875					880	
tta	ata	tca	cac	caa	aga	atg	aaa	aag	cta	ttt	tgg	gaa	gat	gtt	ccg	2688
Leu	Ile	Ser	His	Gln	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Phe	Trp	Glu	Asp	Val	Pro	
				885					890					895		
aac	ccc	aag	aat	tgt	tcc	tgg	gca	caa	gga	ctt	aat	ttt	cag	aag	aga	2736
Asn	Pro	Lys	Asn	Cys	Ser	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Lys	Arg	
				900				905					910			
acg	gac	att	ctg	gat	cca	ccg	gtc	gcc	acc	atg	gtg	agc	aag	ggc	gag	2784
Thr	Asp	Ile	Leu	Asp	Pro	Pro	Val	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	
				915			920					925				
gag	ctg	ttc	acc	ggg	gtg	gtg	ccc	atc	ctg	gtc	gag	ctg	gac	ggc	gac	2832
Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	
						935					940					
gta	aac	ggc	cac	aag	ttc	agc	gtg	tcc	ggc	gag	ggc	gag	ggc	gat	gcc	2880
Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	
					950					955					960	
acc	tac	ggc	aag	ctg	acc	ctg	aag	ttc	atc	tgc	acc	acc	ggc	aag	ctg	2928

ES 2 385 712 T3

Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	
				965					970					975		
ccc	gtg	ccc	tgg	ccc	acc	ctc	gtg	acc	acc	ttc	ggc	tac	ggc	gtg	cag	2976
Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	Gln	
			980					985					990			
tgc	ttc	gcc	cgc	tac	ccc	gac	cac	atg	cgc	cag	cac	gac	ttc	ttc	aag	3024
Cys	Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Arg	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	
		995					1000					1005				
tcc	gcc	atg	ccc	gaa	ggc	tac	gtc	cag	gag	cgc	acc	atc	ttc	ttc		3069
Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe		
	1010					1015					1020					
aag	gac	gac	ggc	aac	tac	aag	acc	cgc	gcc	gag	gtg	aag	ttc	gag		3114
Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu		
	1025					1030					1035					
ggc	gac	acc	ctg	gtg	aac	cgc	atc	gag	ctg	aag	ggc	atc	gac	ttc		3159
Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe		
	1040					1045					1050					
aag	gag	gac	ggc	aac	atc	ctg	ggg	cac	aag	ctg	gag	tac	aac	tac		3204
Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr		
	1055					1060					1065					
aac	agc	cac	aac	gtc	tat	atc	atg	gcc	gac	aag	cag	aag	aac	ggc		3249
Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly		
	1070					1075					1080					
atc	aag	gtg	aac	ttc	aag	atc	cgc	cac	aac	atc	gag	gac	ggc	agc		3294
Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser		
	1085					1090					1095					
gtg	cag	ctc	gcc	gac	cac	tac	cag	cag	aac	acc	ccc	atc	ggc	gac		3339
Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp		
	1100					1105					1110					
ggc	ccc	gtg	ctg	ctg	ccc	gac	aac	cac	tac	ctg	agc	tac	cag	tcc		3384
Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser		
	1115					1120					1125					
gcc	ctg	agc	aaa	gac	ccc	aac	gag	aag	cgc	gat	cac	atg	gtc	ctg		3429
Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu		
	1130					1135					1140					
ctg	gag	ttc	gtg	acc	gcc	gcc	ggg	atc	act	ctc	ggc	atg	gac	gag		3474
Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu		
	1145					1150					1155					
ctg	tac	aag	taa													3486
Leu	Tyr	Lys														
	1160															

<210> 14
 <211> 1161
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> OBR YFP

<220>
 <221> característica_misc
 <223> OBR YFP

10

<400> 14

ES 2 385 712 T3

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

ES 2 385 712 T3

Ile Phe Arg Ser Pro₂₄₅ Leu Met Ser Val Gln₂₅₀ Pro Ile Asn Met Val₂₅₅ Lys
 Pro Asp Pro Pro₂₆₀ Leu Gly Leu His Met₂₆₅ Glu Ile Thr Asp Asp₂₇₀ Gly Asn
 Leu Lys Ile₂₇₅ Ser Trp Ser Ser Pro₂₈₀ Pro Leu Val Pro Phe₂₈₅ Pro Leu Gln
 Tyr Gln Val₂₉₀ Lys Tyr Ser Glu₂₉₅ Asn Ser Thr Thr Val₃₀₀ Ile Arg Glu Ala
 Asp Lys Ile Val Ser Ala₃₁₀ Thr Ser Leu Leu Val₃₁₅ Asp Ser Ile Leu Pro₃₂₀
 Gly Ser Ser Tyr Glu₃₂₅ Val Gln Val Arg Gly₃₃₀ Lys Arg Leu Asp Gly₃₃₅ Pro
 Gly Ile Trp Ser₃₄₀ Asp Trp Ser Thr Pro₃₄₅ Arg Val Phe Thr Thr₃₅₀ Gln Asp
 Val Ile Tyr₃₅₅ Phe Pro Pro Lys Ile₃₆₀ Leu Thr Ser Val Gly₃₆₅ Ser Asn Val
 Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys₃₇₅ Lys Glu Asn Lys Ile₃₈₀ Val Pro Ser Lys
 Glu Ile Val Trp Trp Met₃₉₀ Asn Leu Ala Glu Lys₃₉₅ Ile Pro Gln Ser Gln₄₀₀
 Tyr Asp Val Val Ser₄₀₅ Asp His Val Ser Lys₄₁₀ Val Thr Phe Phe Asn₄₁₅ Leu
 Asn Glu Thr Lys₄₂₀ Pro Arg Gly Lys Phe₄₂₅ Thr Tyr Asp Ala Val₄₃₀ Tyr Cys
 Cys Asn Glu₄₃₅ His Glu Cys His His₄₄₀ Arg Tyr Ala Glu Leu₄₄₅ Tyr Val Ile
 Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser₄₅₅ Cys Glu Thr Asp Gly₄₆₀ Tyr Leu Thr Lys
 Met Thr Cys Arg Trp Ser₄₇₀ Thr Ser Thr Ile Gln₄₇₅ Ser Leu Ala Glu Ser₄₈₀
 Thr Leu Gln Leu Arg₄₈₅ Tyr His Arg Ser Ser₄₉₀ Leu Tyr Cys Ser Asp₄₉₅ Ile
 Pro Ser Ile His₅₀₀ Pro Ile Ser Glu Pro₅₀₅ Lys Asp Cys Tyr Leu₅₁₀ Gln Ser

ES 2 385 712 T3

Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
 515 520 525
 Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
 530 535 540
 Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
 545 550 555 560
 Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
 565 570 575
 Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
 580 585 590
 Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
 595 600 605
 Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
 610 615 620
 Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
 625 630 635 640
 Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
 645 650 655
 Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
 660 665 670
 Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
 675 680 685
 Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
 690 695 700
 Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
 705 710 715 720
 Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
 725 730 735
 Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
 740 745 750
 Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
 755 760 765
 Leu Asn Ser ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
 770 775 780

ES 2 385 712 T3

Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
 785 790 795 800
 Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
 805 810 815
 Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
 820 825 830
 Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
 835 840 845
 Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
 850 855 860
 Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
 865 870 875 880
 Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
 885 890 895
 Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
 900 905 910
 Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu
 915 920 925
 Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
 930 935 940
 Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
 945 950 955 960
 Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
 965 970 975
 Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln
 980 985 990
 Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys
 995 1000 1005
 Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
 1010 1015 1020
 Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 1025 1030 1035
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe
 1040 1045 1050

ES 2 385 712 T3

Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
 1055 1060 1065
 Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 1070 1075 1080
 Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 1085 1090 1095
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
 1100 1105 1110
 Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser
 1115 1120 1125
 Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
 1130 1135 1140
 Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
 1145 1150 1155
 Leu Tyr Lys
 1160

<210> 15
 <211> 396
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(396)
 <223>

10 <400> 15

atg gca ggc atc aaa gct ttg att agt ttg tcc ttt gga gga gca atc	48
Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile	
1 5 10 15	
gga ctg atg ttt ttg atg ctt gga tgt gcc ctt cca ata tac aac aaa	96
Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys	
20 25 30	
tac tgg ccc ctc ttt gtt cta ttt ttt tac atc ctt tca cct att cca	144
Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro	
35 40 45	
tac tgc ata gca aga aga tta gtg gat gat aca gat gct atg agt aac	192

ES 2 385 712 T3

```

Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
 50          55          60
gct tgt aag gaa ctt gcc atc ttt ctt aca acg ggc att gtc gtg tca      240
65 Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
70          75
gct ttt gga ctc cct att gta ttt gcc aga gca cat ctg att gag tgg      288
Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
85          90          95
gga gct tgt gca ctt gtt ctc aca gga aac aca gtc atc ttt gca act      336
Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr
100          105          110
ata cta ggc ttt ttc ttg gtc ttt gga agc aat gac gac ttc agc tgg      384
Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp
115          120          125
cag cag tgg tga
Gln Gln Trp
130

```

<210> 16
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

```

<400> 16
Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile
1          5          10          15
Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys
20          25          30
Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro
35          40          45
Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
50          55          60
Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
65          70          75          80
Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
85          90          95
Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr
100          105          110
Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp
115          120          125
Gln Gln Trp
130

```

<210> 17
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> característica_misc
 <223> MY47 LUC

15

ES 2 385 712 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1359)
 <223>

5 <400> 17

atg gca ggc atc aaa gct ttg att agt ttg tcc ttt gga gga gca atc	48
Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile	
1 5 10 15	
gga ctg atg ttt ttg atg ctt gga tgt gcc ctt cca ata tac aac aaa	96
Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys	
20 25 30	
tac tgg ccc ctc ttt gtt cta ttt ttt tac atc ctt tca cct att cca	144
Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro	
35 40 45	
tac tgc ata gca aga aga tta gtg gat gat aca gat gct atg agt aac	192
Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn	
50 55 60	
gct tgt aag gaa ctt gcc atc ttt ctt aca acg ggc att gtc gtg tca	240
Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser	
65 70 75 80	
gct ttt gga ctc cct att gta ttt gcc aga gca cat ctg att gag tgg	288
Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp	
85 90 95	
gga gct tgt gca ctt gtt ctc aca gga aac aca gtc atc ttt gca act	336
Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr	
100 105 110	
ata cta ggc ttt ttc ttg gtc ttt gga agc aat gac gac ttc agc tgg	384
Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp	
115 120 125	
cag cag tgg cga ccg gtg gat cca ccg gct aga gcc acc atg acc agc	432
Gln Gln Trp Arg Pro Val Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser	
130 135 140	

ES 2 385 712 T3

aag Lys 145	gtg Val	tac Tyr	gac Asp	ccc Pro	gag Glu 150	cag Gln	agg Arg	aag Lys	agg Arg	atg Met 155	atc Ile	acc Thr	ggc Gly	ccc Pro	cag Gln 160	480
tgg Trp	tgg Trp	gcc Ala	agg Arg	tgc Cys 165	aag Lys	cag Gln	atg Met	aac Asn	gtg Val 170	ctg Leu	gac Asp	agc Ser	ttc Phe 175	atc Ile	aac Asn	528
tac Tyr	tac Tyr	gac Asp 180	agc Ser	gag Glu	aag Lys	cac His	gcc Ala 185	gag Glu 185	aac Asn	gcc Ala	gtg Val	atc Ile	ttc Phe 190	ctg Leu	cac His	576
ggc Gly	aac Asn	gcc Ala 195	gct Ala	agc Ser	agc Ser	tac Tyr	ctg Leu 200	tgg Trp	agg Arg	cac His	gtg Val 205	gtg Val 205	ccc Pro	cac His	atc Ile	624
gag Glu 210	ccc Pro	gtg Val	gcc Ala	agg Arg	tgc Cys	atc Ile 215	atc Ile	ccc Pro	gat Asp	ctg Leu	atc Ile 220	ggc Gly	atg Met	ggc Gly	aag Lys	672
agc Ser 225	ggc Gly	aag Lys	agc Ser	ggc Gly	aac Asn 230	ggc Gly	agc Ser	tac Tyr	agg Arg	ctg Leu 235	ctg Leu	gac Asp	cac His	tac Tyr	aag Lys 240	720
tac Tyr	ctg Leu	acc Thr	gcc Ala	tgg Trp 245	ttc Phe	gag Glu	ctc Leu	ctg Leu	aac Asn 250	ctg Leu	ccc Pro	aag Lys	aag Lys	atc Ile 255	atc Ile	768
ttc Phe	gtg Val	ggc Gly	cac His 260	gac Asp	tgg Trp	ggc Gly	gcc Ala	tgc Cys 265	ctg Leu	gcc Ala	ttc Phe	cac His	tac Tyr 270	agc Ser	tac Tyr	816
gag Glu	cac His	cag Gln 275	gac Asp	aag Lys	atc Ile	aag Lys	gcc Ala 280	atc Ile	gtg Val	cac His	gcc Ala	gag Glu 285	agc Ser	gtg Val	gtg Val	864
gac Asp 290	gtg Val	atc Ile	gag Glu	agc Ser	tgg Trp	gac Asp 295	gag Glu	tgg Trp	cca Pro	gac Asp	atc Ile 300	gag Glu	gag Glu	gac Asp	atc Ile	912
gcc Ala 305	ctg Leu	atc Ile	aag Lys	agc Ser	gag Glu 310	gag Glu	ggc Gly	gag Glu	aag Lys	atg Met 315	gtg Val	ctg Leu	gag Glu	aac Asn	aac Asn 320	960
ttc Phe	ttc Phe	gtg Val	gag Glu	acc Thr 325	atg Met	ctg Leu	ccc Pro	agc Ser	aag Lys 330	atc Ile	atg Met	aga Arg	aag Lys	ctg Leu 335	gag Glu	1008
ccc Pro	gag Glu	gag Glu	ttc Phe 340	gcc Ala	gcc Ala	tac Tyr	ctg Leu	gag Glu 345	ccc Pro	ttc Phe	aag Lys	gag Glu	aag Lys 350	ggc Gly	gag Glu	1056
gtg Val	aga Arg 355	aga Arg	ccc Pro	acc Thr	ctg Leu	agc Ser	tgg Trp 360	ccc Pro	aga Arg	gag Glu	atc Ile	ccc Pro 365	ctg Leu	gtg Val	aag Lys	1104
ggc Gly	ggc Gly 370	aag Lys	ccc Pro	gac Asp	gtg Val	gtg Val 375	cag Gln	atc Ile	gtg Val	aga Arg	aac Asn 380	tac Tyr	aac Asn	gcc Ala	tac Tyr	1152
ctg Leu 385	aga Arg	gcc Ala	agc Ser	gac Asp	gac Asp 390	ctg Leu	ccc Pro	aag Lys	atg Met	ttc Phe 395	atc Ile	gag Glu	agc Ser	gac Asp	ccc Pro 400	1200
ggc Gly	ttc Phe	ttc Phe	agc Ser	aac Asn 405	gcc Ala	atc Ile	gtg Val	gag Glu	ggc Gly 410	gcc Ala	aag Lys	aag Lys	ttc Phe	ccc Pro 415	aac Asn	1248
acc Thr	gag Glu	ttc Phe	gtg Val 420	aag Lys	gtg Val	aag Lys	ggc Gly	ctg Leu 425	cac His	ttc Phe	agc Ser	cag Gln	gag Glu 430	gac Asp	gcc Ala	1296
ccc Pro	gac Asp	gag Glu 435	atg Met	ggc Gly	aag Lys	tac Tyr	atc Ile 440	aag Lys	agc Ser	ttc Phe	gtg Val	gag Glu 445	aga Arg	gtg Val	ctg Leu	1344
aag Lys	aac Asn	gag Glu	cag Gln	taa												1359
450																

<210> 18
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> característica_misc
 <223> MY47 LUC
 <400> 18

Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys
 20 25 30

Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
 50 55 60

Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
 85 90 95

Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr
 100 105 110

Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125

Gln Gln Trp Arg Pro Val Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser
 130 135 140

10

ES 2 385 712 T3

Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln
 145 150 155 160
 Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn
 165 170 175
 Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His
 180 185 190
 Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile
 195 200 205
 Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys
 210 215 220
 Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys
 225 230 235 240
 Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile
 245 250 255
 Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr
 260 265 270
 Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile
 290 295 300
 Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu
 325 330 335
 Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu
 340 345 350
 Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr
 370 375 380
 Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro
 385 390 395 400
 Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn
 405 410 415
 Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala
 420 425 430
 Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu
 435 440 445
 Lys Asn Glu Gln
 450

<210> 19
 <211> 1140
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> MYO47 YFP

<220>
 <221> característica_misc
 <223> MY47 YFP

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1140)
 <223>

<400> 19

atg gca ggc atc aaa gct ttg att agt ttg tcc ttt gga gga gca atc	48
Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile	
1 5 10 15	
gga ctg atg ttt ttg atg ctt gga tgt gcc ctt cca ata tac aac aaa	96
Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys	
20 25 30	
tac tgg ccc ctc ttt gtt cta ttt ttt tac atc ctt tca cct att cca	144
Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro	
35 40 45	
tac tgc ata gca aga aga tta gtg gat gat aca gat gct atg agt aac	192
Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn	
50 55 60	
gct tgt aag gaa ctt gcc atc ttt ctt aca acg ggc att gtc gtg tca	240
Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser	
65 70 75 80	
gct ttt gga ctc cct att gta ttt gcc aga gca cat ctg att gag tgg	288
Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp	
85 90 95	

15

ES 2 385 712 T3

gga gct tgt gca ctt gtt ctc aca gga aac aca gtc atc ttt gca act Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr	336
ata cta ggc ttt ttc ttg gtc ttt gga agc aat gac gac ttc agc tgg Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp	384
cag cag tgg cga ccg gtg gat cca ccg gtc gcc acc atg gtg agc aag Gln Gln Trp Arg Pro Val Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys	432
ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp	480
ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly	528
gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly	576
aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctg gtg acc acc ttc ggc tac ggc Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly	624
gtg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg cgc cag cac gac ttc Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe	672
ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe	720
ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu	768
ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys	816
gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser	864
cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val	912
aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctg gcc Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala	960
gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu	1008
ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro	1056
aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala	1104
ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys	1140

<210> 20
<211> 379

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> MYO47 YFP

5 <220>
<221> característica_misc
<223> MY47 YFP

<400> 20

Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile
1 5 10 15

Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys
20 25 30

Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro
35 40 45

Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
50 55 60

Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
65 70 75 80

Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
85 90 95

Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr
100 105 110

Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp
115 120 125

Gln Gln Trp Arg Pro Val Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys
130 135 140

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
145 150 155 160

10

ES 2 385 712 T3

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

<210> 21

<211> 1114

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

gtctggcttg ggcaggctgc ccgggccgtg gcaggaagcc ggaagcagcc gcggccccag 60

ttcgggagac atggcgggcg ttaaagctct cgtggcatta tccttcagtg gggctatttg 120

actgactttt cttatgctgg gatgtgcctt agaggattat ggcgtttact ggcccttatt 180

cgtcctgatt ttccacgcca tctcccccat cccccatttc attgccaaaa gagtacaccta 240

tgactcagat gcaaccagta gtgcctgtcg ggaactggca tatttcttca ctactggaat 300

tgttgtttct gcctttggat ttcctgttat tcttgctcgt gtggctgtga tcaaattggg 360

agcctgcggc cttgtgttgg caggcaatgc agtcattttc cttacaattc aagggttttt 420

ccttatattt ggaagaggag atgatttttag ctgggagcag tggtagcact ttattctgat 480

tacagtgcac tgaatttctt agaactcata ctatctgtat acatgtgcac atgcggcatt 540

ttactatgaa atttaatatg ctgggttttt taataccttt atatatcatg ttacttttaa 600

gaaagacttc ataagtagga gatgagtttt attctcagca aatagacctg tcaaatttag 660

attatgttac tcaaattatg ttacttgttt ggctgttcat gtagtcacgg tgctctcaga 720

aaatatatta acgcagtcctt gtaggcagct gccaccttat gcagtgcac gaaacctttt 780

gcttggggat gtgcttggag aggcagataa cgctgaagca ggcctctcat gaccaggaa 840

ggccgggggtg gatccctctt tgtgtttag tccatgctat taaaagtgtg gccacagac 900

caagagcctc aacatttctt agagccttat tagaaatgca gaatctgaag cccactctg 960

gaccaggac attttgatga gatccaaagg agttgtatgc acatgaaagt ttgagaagca 1020

tcatcataga gaagtaaaca tcacaccaa cttccttatac tttccagtgg ctaaaccact 1080

taacctctct ggggtgttacc tgctcatttg tttta 1114

5 <210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> AS01

10 <400> 22
gcttctgcc acggcccggg 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> AS02

<400> 23
gcatgtctc ccgaactggg 20

20 <210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> AS03

	<400> 24 aacgcccgcc atgtctcccg	20
5	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> AS04	
10	<400> 25 agagctttaa cgcccgccat	20
	<210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> AS05	
	<400> 26 ggataatgcc acgagagctt	20
20	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> AS06	
25	<400> 27 aaggcacatc ccagcataag	20
	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> AS07	
	<400> 28 ccataatcct ctaaggcaca	20
35	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> AS08	
40	<400> 29 cagtaaacgc cataatcctc	20
	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> AS09	
50	<400> 30 aataagggcc agtaaagccc	20

	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> AS10	
	<400> 31	
	atgccagttc ccgacaggca	20
10	<210> 32	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> AS11	
15	<400> 32	
	aaatatgcca gttcccgaca gg	22
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> AS12	
	<400> 33	
	aagaaatatg ccagttcccg	20
25	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> AS13	
	<400> 34	
	cattgcctgc caacacaagg	20
	<210> 35	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> AS15	
	<400> 35	
40	aaccgccgac ctgtcctccg	20
	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> AS16	
	<400> 36	
	aaatctgcac gttacagcca gg	22
	<210> 37	
50	<211> 21	

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 5 <400> 37
 guggccugucg ggaacuggct t 21

 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 <400> 38
 gccaguuccc gacaggcact t 21

 15 <210> 39
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Artificial

 <400> 39
 tctcttgaat gaaacacatg tgcacacaca aacaaggc 38

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

 <220>
 <223> Artificial

 <400> 40
 30 gctctagaaa aatgtgtgca catgtgttc atctcttgaa 40

 <210> 41
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> Artificial

 <400> 41
 ccatctaggc caagcttatc cgacgccgcc atctc 35

 <210> 42
 40 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 45 <400> 42
 tgtgtgcaca tgtgtttcat tcaagagatg aaacacatgt gcacaca 47

 <210> 43
 <211> 14
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223> Artificial		
	<400> 43		
	ccgtggcagg aagc	14	
5	<210> 44		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
10	<220>		
	<223> Artificial		
	<400> 44		
	gcagcgacag cccagctcc	20	
	<210> 45		
	<211> 16		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Artificial		
	<400> 45		
20	cagccacacg agcaag	16	
	<210> 46		
	<211> 15		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> Artificial		
	<400> 46		
	ggagaaggct ggggc	15	
	<210> 47		
30	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Artificial		
35	<400> 47		
	gatggcatgg actgtgg	17	

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido opcionalmente modificado que comprende de 8 a 50 nucleótidos que hibrida de manera específica con la secuencia SEQ ID N° 1 e inhibe la expresión de OB-RGRP, caracterizado porque comprende una secuencia que presenta una identidad de al menos 90% con la secuencia SEQ ID NO:2.
- 5 2. Oligonucleótido según la reivindicación 1 caracterizado porque favorece la expresión de los receptores de la leptina en la superficie celular.
3. Oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado porque es un antisentido.
4. Oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque los nucleótidos están tioesterificados.
- 10 5. Oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque los nucleótidos están 2' O-metilados.
6. Oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque presenta un residuo trietilenglicol en su extremo 3'.
7. Oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque es monocatenario.
- 15 8. Oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 7 en el que los nucleótidos en posiciones 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 20, en el sentido 5' hacia 3', están tioesterificados.
9. Oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 7 en el que los nucleótidos en posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 y 20, en el sentido 5' hacia 3', están 2' O-metilados.
10. Oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque es un ADN.
- 20 11. Oligonucleótido de tipo Ácido Ribonucleico de Interferencia (ARNi) que comprende de 15 a 60 nucleótidos que hibrida de manera específica con la secuencia SEQ ID N° 21 e inhibe la expresión de OB-RGRP, caracterizado porque es un ARN bicatenario y porque al menos una de las dos cadenas comprende una secuencia que presenta una identidad de al menos 90 %, con una de las secuencias SEQ ID N° 37 o SEQ ID N° 38.
- 25 12. Oligonucleótido de tipo Ácido Ribonucleico de Interferencia (ARNi) que comprende de 15 a 60 nucleótidos que hibrida de manera específica con la secuencia SEQ ID N° 21 e inhibe la expresión de OB-RGRP, caracterizado porque es un ARN monocatenario y porque comprende una secuencia que presenta una identidad de al menos 90 %, con la secuencia SEQ ID N° 42.
13. Vector que expresa un oligonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 3, 11 y 12.
14. Célula que contiene un vector según la reivindicación 13.

30

Figura 1:

AS 01: 3'-teg-G*G*G C*C*C*G G*C A*C*C G*T*C*C T*T*C*G
 AS 02: 3'-teg-G*G*G*T*C A A G*C*C*C T*C*T G*T A*C*C*G
 AS 03: 3'-teg-G*C*C*C T*C*T G*T A*C*C G*C*C*C G*C*A*A
 AS 04: 3'-teg-T*A*C*C G*C*C*C G*C A A*T*T*T*C G A*G*A
 AS 05: 3'-teg-T*T*C*G A G A*G*C A*C*C G*T A A*T A*G*G
 AS 06: 3'-teg-G*A*A*T A*C G A*C*C*C*T A*C A*C G G*A*A
 AS 07: 3'-teg-A*C*A*C G G A A*T*C*T C*C*T*A A*T A*C*C
 AS 08: 3'-teg-C*T*C*C*T A A*T A*C*C G*C A A*A*T G*A*C
 AS 09: 3'-teg-C*C*G*C*A A A*T G A*C*C*G G G A*A T*A*A
 AS 10: 3'-teg-A*C*G G A*C A G*C*C*C T*T*G A*C C G*T*A
 AS 11: 3'-teg-G*G*A*C A G*C*C*C T*T*G A*C*C G*T A*T A*A*A
 AS 12: 3'-teg-G*C*C*C T*T*G A*C*C G*T A*T A A*A G*A*A
 AS 13: 3'-teg-G*G*A A*C*A*C A A*C*C*G T*C*C*G T*T*A*C
 AS 14: 3'-teg-T*G*T A*C A*C G*T G*T A*C G*C*C G*T A*A
 AS 15: 3'-teg-G*C*C*T C*C*T G*T C*C*A G*C*C*G C*C*A*A
 AS 16: 3'-teg-G*G*A*C*C G A*C*A T*T*G C*A*C G*T C*T A*A*A

*: Tioéster

 : 2'O-Metilación

teg: espaciador Trietilenglicol

Figura 2

	10	20	30	40	50	60
OB-RGRP_humana	-----	MAG-VKALVALSFSGAIGLTFLMLGCALEDYGVYWPFLVLI	FHAIS			
My47_humana	-----	MAG-IKALISLSFGGAIGLMFLMLGCALPIYNKYWPFLVLF	FYILS			
yt02_C.elegans	MCCHIHIQCFDCCSMKNTILAVAALAFAGVVG	LTFLVLGCALPRYGTWTPMFVITFFYVLS				
YJ14_Levadura	-----	MMEFKVSPLTKIISLSGFLALGFLLVILSCAL--	FHNYYP	LDILIFLLA		
Consenso	MCCHIHIQCF2222	MAG2IKALI2LSF4GAIGLTFLMLGCALP3YG4YWPLFV24FY4LS				

	70	80	90	100	110	120
OB-RGRP_humana	PIPHFI	AKR----	VFYDS	DATSSACRE	LAYFFT	TGIVVSAFGFPVILARVAVIKWGACG
My47_humana	PIPYCI	ARR----	LVDDT	DAMSNACKELAI	FLTTGIVVSAFGLPIVFARAH	LIEWGACA
yt02_C.elegans	PVPLLI	ARR----	FQEDM	TGTN-ACI	ELALFITTGIVISAFALPIVLA	HAGTIAMSACF
YJ14_Levadura	PIPNTI	FNAGNKYHTSD	FMSDSSNTGQDLA	HFLTGMLVTS	GI	ALPVPVYHQCQLIGHLS
Consenso	PIP44IARRGNKYH44DDMDATSNAC4ELA4FLTTGIVVSAF2LP2V2A2A4LI4WGAC4					

	130	140	150
OB-RGRP_humana	LVL	AGNAVIFLTIQGF	FLIFGRGDDFSWEQW-
My47_humana	LVL	TGNTVIFATILGF	FLVFGSKDDFSWQW-
yt02_C.elegans	LIF	ANSINFSVIIF	YERIFNGEDMNGMSLW-
YJ14_Levadura	MCM	IGGLIIYSSIVIFK	WFFKKDFNEDDSLFG
Consenso	LVLIGN42IFSTI4GFFLIFG44DDFSWS2WG		

Figura 3A

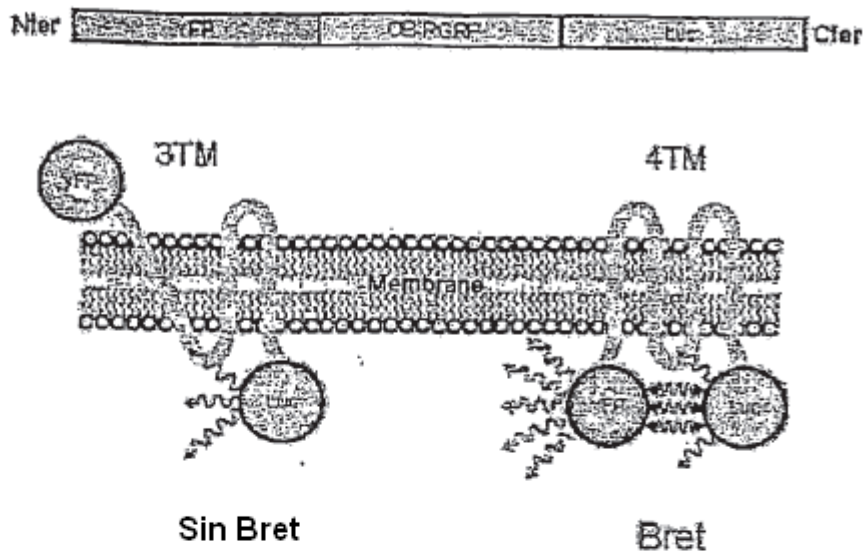


Figura 3B

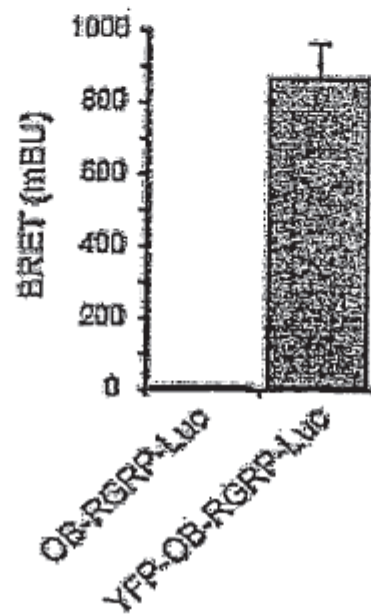


Figura 4 A

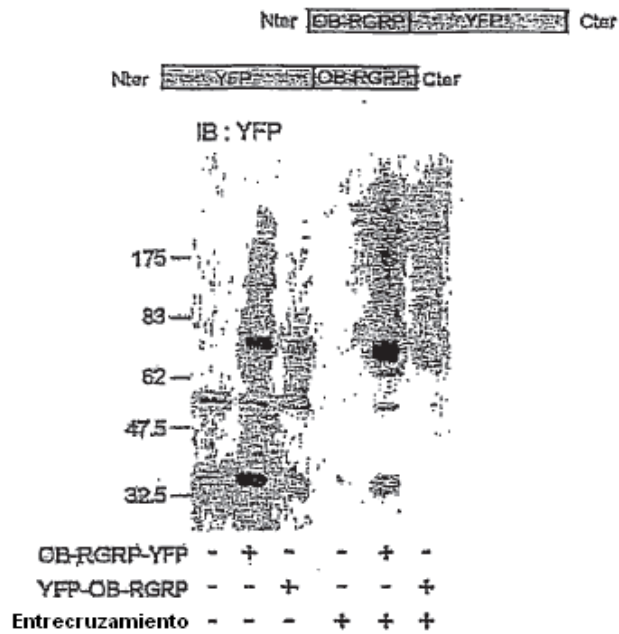


Figura 4 B

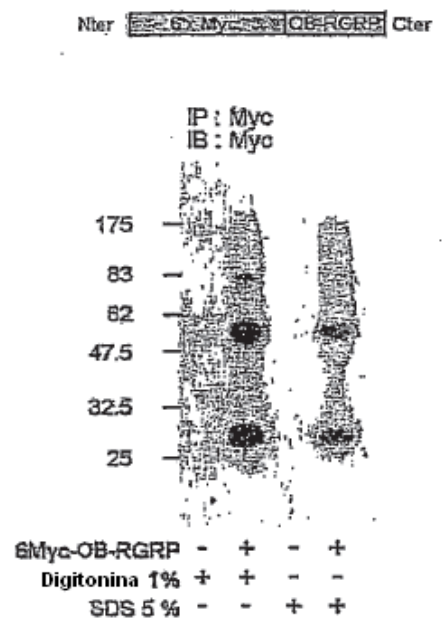


Figura 5

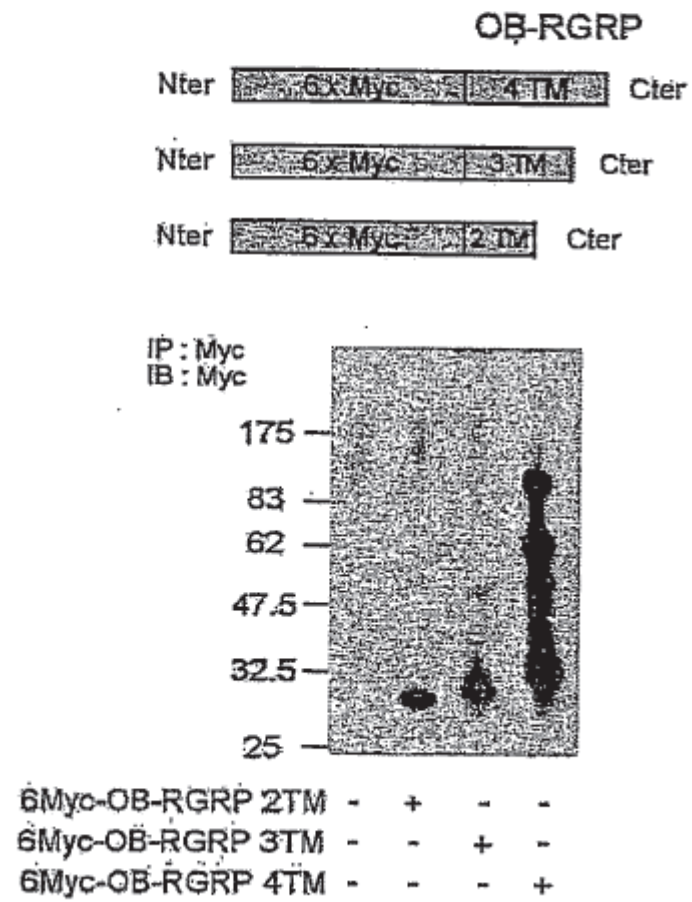


Figura 6A

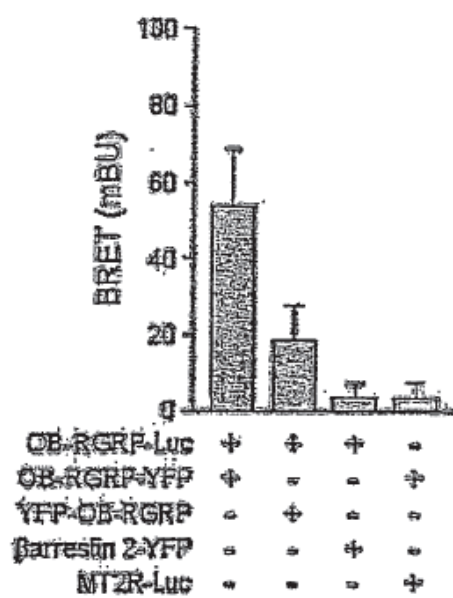


Figura 6 B

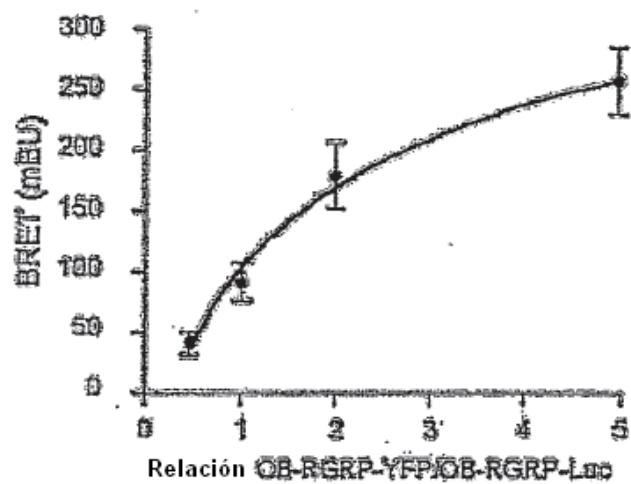


Figura 7

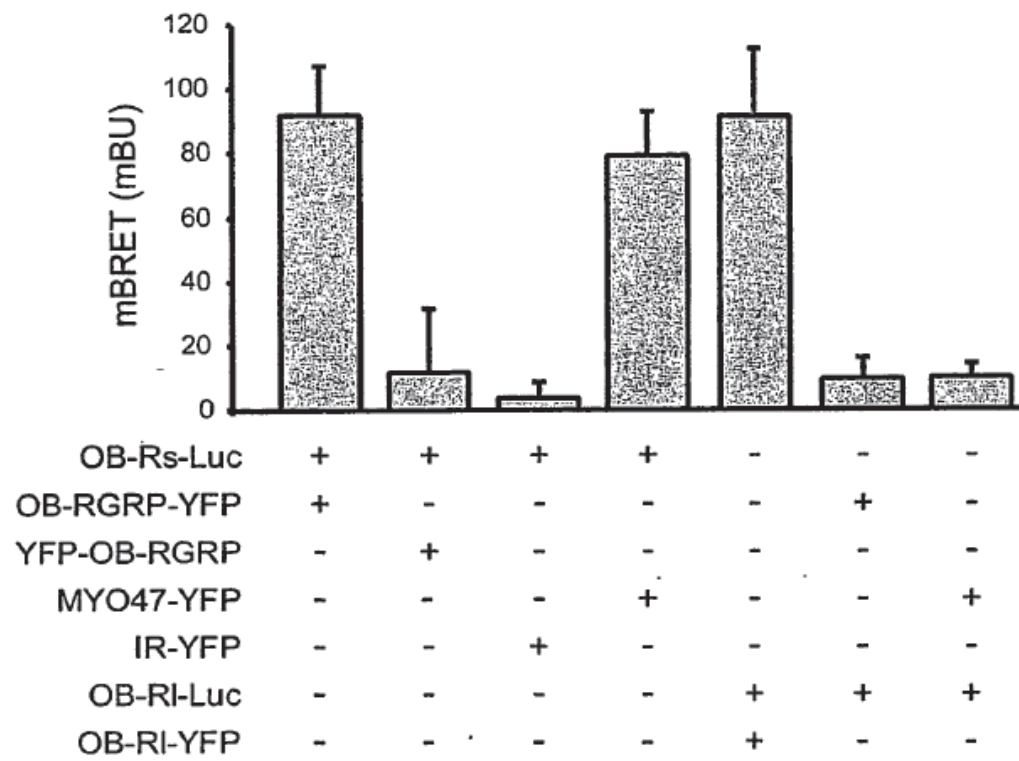


Figura 8 a

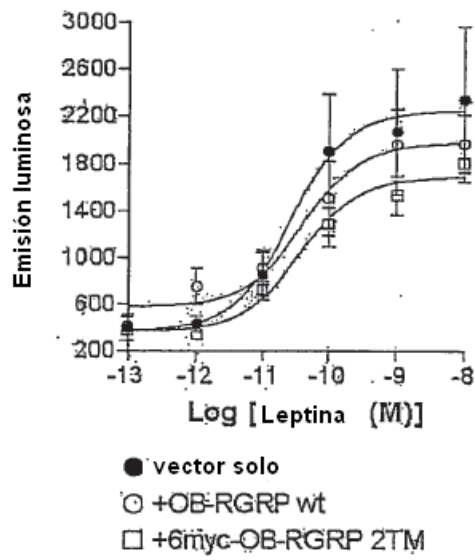


Figura 8 b

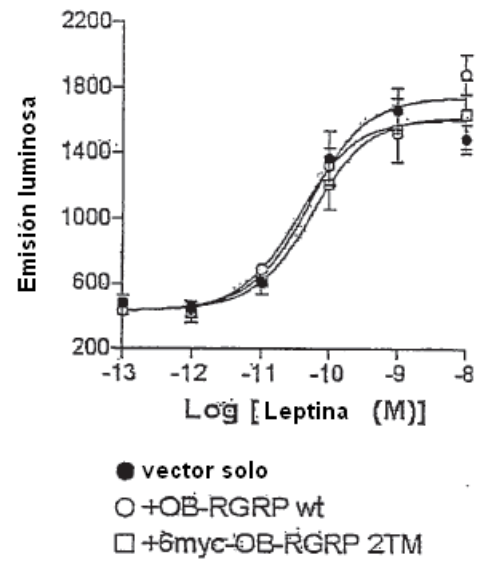
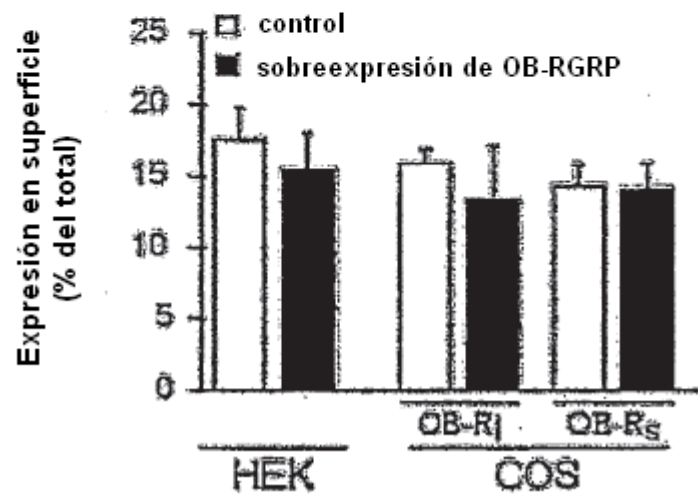


Figura 9



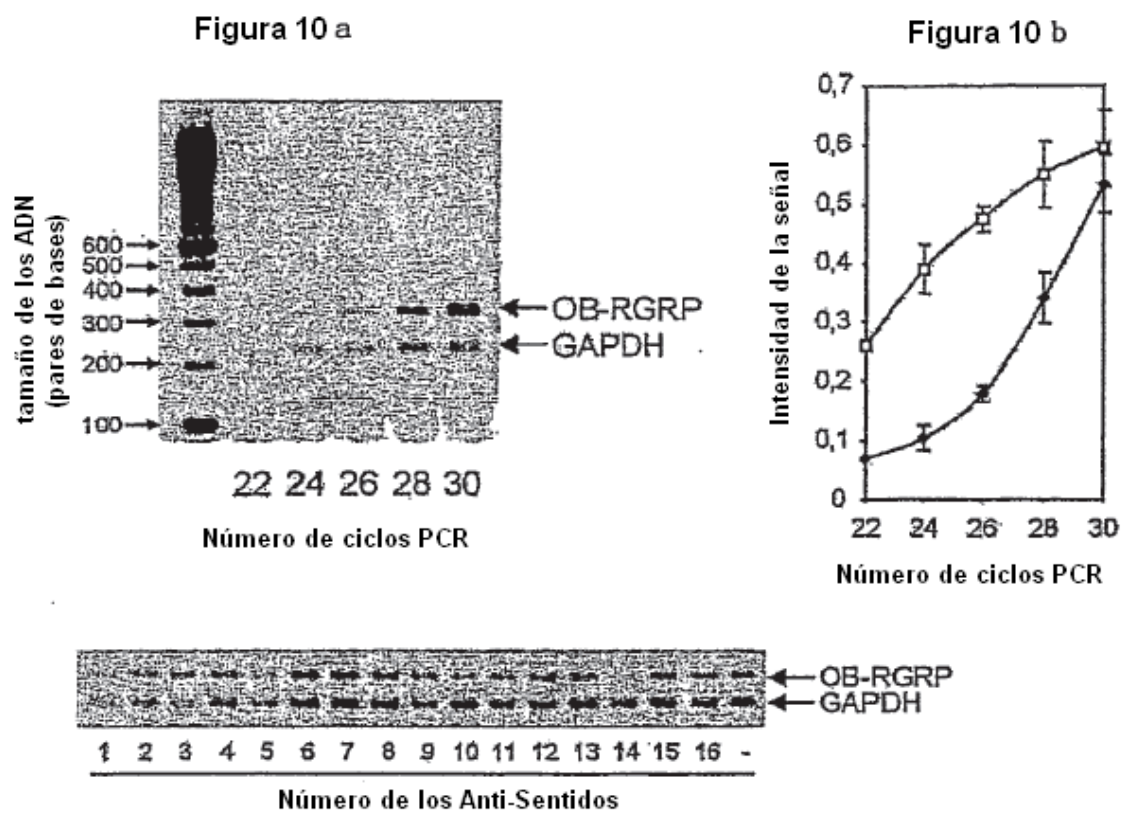


Figura 11A

5' - gugccugucgggaacuggcTT -3'
3' - TTcacggacagcccuugaccg -5'



Figura 11C

Figura 11B

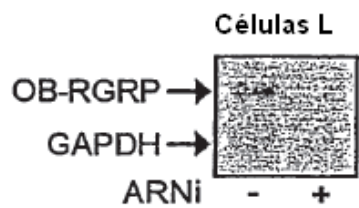
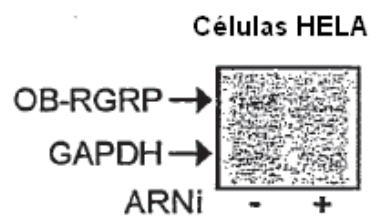


Figura 11D

Figura 12

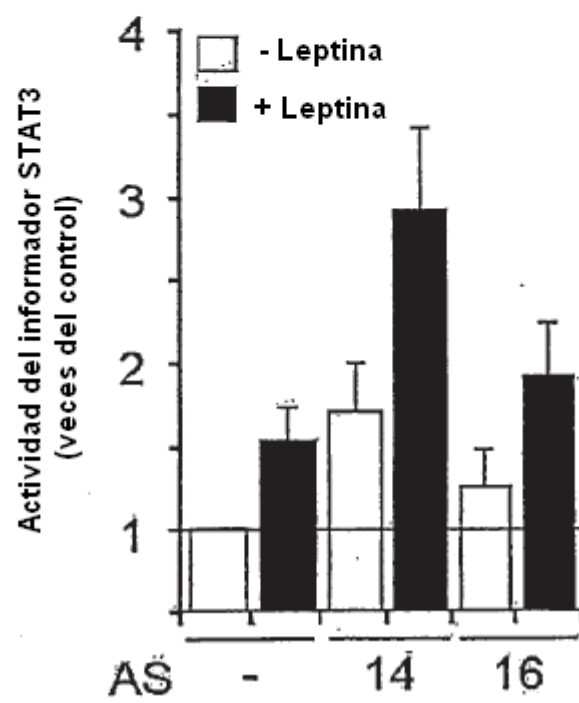


Figura 13

