

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 441**

51 Int. Cl.:

A61P 19/08 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2007 E 07710624 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 1994155**

54 Título: **Secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas implicadas en el proceso de remodelación ósea**

30 Prioridad:

13.02.2006 US 772585 P
28.06.2006 US 816858 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2013

73 Titular/es:

ALETHIA BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
141, AVENUE PRÉSIDENT-KENNEDY SB-5100
MONTREAL, QC H2X 1Y4, CA

72 Inventor/es:

SOOKNANAN, ROY RABINDRANAUTH;
TREMBLAY, GILLES BERNARD y
FILION, MARIO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 441 T3

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

DESCRIPCIÓN

Secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas implicadas en el proceso de remodelación ósea.

Campo de la invención

5 La invención se refiere, en parte, a polinucleótidos genéticos únicos y recién identificados que intervienen en el proceso de la remodelación ósea; variantes y derivados de los polinucleótidos y los correspondientes polipéptidos; usos de los polinucleótidos, polipéptidos, variantes y derivados; procedimientos y composiciones para la mejora de los síntomas ocasionados por trastornos de remodelación ósea, que incluyen pero sin limitarse a ellos, osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercortisolismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, 10 enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo (que incluye el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, y el dependiente de vitamina D de tipos I y II), fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos tal como picnodisostosis y daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos.

15 En particular, esta invención se refiere a perfiles de expresión de polinucleótidos en osteoclastos activos, el aislamiento y la identificación de polinucleótidos, polipéptidos, variantes y derivados implicados en la actividad de los osteoclastos, validación de los polinucleótidos identificados para ver si son posiblemente dianas terapéuticas, y uso de los polinucleótidos, polipéptidos, variantes y derivados para la mejora de estados patológicos y propósitos de investigación, así como para el diagnóstico de estados patológicos o para la predisposición a padecerlos.

20 Antecedentes de la invención

El hueso es un tejido conjuntivo dinámico comprendido por poblaciones de células que realizan funciones diferentes necesarias para mantener la integridad estructural, mecánica y bioquímica del hueso y la homeostasis mineral del cuerpo humano. Los principales tipos de células implicados incluyen los osteoblastos responsables de la formación de hueso y el mantenimiento de la masa ósea, y los osteoclastos responsables de la osteoclasia (resorción ósea). 25 Los osteoblastos y los osteoclastos intervienen en un proceso dinámico denominado remodelación ósea. El desarrollo y la proliferación de estas células a partir de sus progenitores están gobernados por redes de factores de crecimiento y citocinas producidos en el microentorno del hueso, así como por hormonas sistémicas. La remodelación ósea se produce a lo largo de la vida del individuo y es necesaria para el mantenimiento del tejido óseo sano y la homeostasis mineral. El proceso permanece en buena parte en equilibrio y está gobernado por una interacción compleja de hormonas sistémicas, péptidos y proteínas posteriores de las vías de señalización, factores de transcripción locales, citocinas, factores de crecimiento y genes de remodelación de la matriz.

Cualquier interferencia o desequilibrio que surja en el proceso de remodelación ósea puede generar una osteopatía, de manera que los trastornos óseos más frecuentes se caracterizan por una disminución neta en la masa ósea. Una causa importante de esta reducción de la masa ósea es un incremento del número de osteoclastos y/o de su actividad. La más frecuente de estas enfermedades, y quizás la mejor conocida, es la osteoporosis que se produce en particular en las mujeres tras el comienzo de la menopausia. De hecho, la osteoporosis es la causa subyacente más significativa de las fracturas óseas de las mujeres de mediana edad y ancianas. Mientras que se ha insistido mucho en que la falta de estrógenos es un factor de la osteoporosis tras la menopausia, hay muchas pruebas de que la remodelación es un proceso controlado de forma local que tiene lugar en tramos discretos por todo el esqueleto, como describió por primera vez Frost hace unos cuarenta años (Frost H. M. 1964). 40

Dado que la remodelación ósea tiene lugar en tramos discretos, para el inicio de la osteoclasia y el proceso de remodelación normal pueden ser más importantes que las hormonas sistémicas las hormonas y las enzimas producidas de forma local. Tal control local está mediado por los osteoblastos y los osteoclastos del microentorno en el que operan. Por ejemplo, los osteoclastos se adhieren a la matriz ósea y forman compartimentos independientes entre ellos mismos y la superficie ósea, delimitados por una zona de cierre hermético formada por un anillo de actina que rodea el borde rugoso o en cepillo. Muchas vesículas pequeñas transportan las enzimas hacia la matriz ósea y captan la matriz ósea parcialmente digerida. El microentorno dentro de la zona del cierre hermético es rica en enzimas lisosómicas y muy ácida en comparación con el pH fisiológico normal del cuerpo. La membrana del borde en cepillo también expresa RANK, el receptor de RANKL, y el receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), y ambos son responsables de la diferenciación de los osteoclastos, al igual que el receptor de la calcitonina es capaz de inactivar rápidamente al osteoclasto (Baron, R. 2003). 45 50

En una estructura compleja de inhibición y estimulación que todavía no se conoce totalmente, la hormona del crecimiento, el factor 1 de crecimiento insulinoide, los corticoesteroides sexuales, la hormona tiroidea, las hormonas calciótropas, tales como la PTH y la prostaglandina E₂, distintas citocinas, tal como la interleucina-1 β , interleucina 6 y el factor α de la necrosis tumoral, y la 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol) actúan coordinadamente en el proceso de remodelación ósea (Jilka et al., 1992; Poli et al., 1994; Srivastava et al. 1998; de Vemejoul 1996). 55

Así pues, es razonable que los entornos locales únicos creados por estas células especializadas se deban a la expresión de, o bien secuencias genéticas únicas que no se expresan en otros tejidos, y/o bien variantes de ajuste

de polinucleótidos y polipéptidos expresados en otros tejidos. El aislamiento y la identificación de los polinucleótidos, polipéptidos y sus variantes y derivados específicos de la actividad de los osteoclastos permitirán un conocimiento más claro del proceso de remodelación y ofrecerá dianas terapéuticas específicas del tejido para el tratamiento de estados patológicos relacionados con la remodelación ósea.

5 Muchas enfermedades ligadas a la remodelación ósea se conocen mal, son por lo general intratables o se pueden tratar tan sólo hasta cierto punto. Por ejemplo, la artrosis es difícil de tratar porque no hay cura y el tratamiento se centra en aliviar el dolor e impedir la deformación de la articulación afectada. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se utilizan de forma general para aliviar el dolor.

10 Otro ejemplo es la osteoporosis, en la que los únicos fármacos que en la actualidad la FDA ha autorizado para el uso en los Estados Unidos son los fármacos inhibidores la osteoclasia que impiden la pérdida de hueso. El tratamiento sustitutivo con estrógenos es un ejemplo de fármaco inhibidor de la osteoclasia. Otros incluyen ácido alendrónico (Fosamax, un inhibidor de la osteoclasia de tipo bisfosfonato), ácido risedrónico (Actonel, un inhibidor de la osteoclasia de tipo bisfosfonato), raloxifeno (Evista, un modulador selectivo del receptor de estrógenos [SERM, por su nombre en inglés]), calcitonina (Calxynar, una hormona) y la paratirina/teriparatida (Forteo, una versión sintética de la hormona humana, paratirina, que ayuda a regular el metabolismo del calcio).

15 Los bisfosfonatos tales como el ácido alendrónico y el ácido risedrónico se fijan permanentemente a la superficie del hueso e interfieren con la actividad de los osteoclastos. Esto permite que los osteoblastos funcionen más rápidos que la velocidad de resorción. Los efectos secundarios más frecuentes son náuseas, dolor abdominal y trastorno de los movimientos peristálticos. Sin embargo, se ha descrito que el ácido alendrónico también provoca irritación e inflamación del esófago y, en algunos casos, úlceras esofágicas. El ácido risedrónico es diferente del alendrónico desde el punto de vista químico y también tiene menos probabilidad de provocar la irritación esofágica. Sin embargo, algunos alimentos, el calcio, los suplementos de hierro, las vitaminas y los minerales, o los antiácidos que contienen calcio, magnesio o aluminio, pueden reducir la absorción del ácido risedrónico, lo que da lugar a una pérdida de la eficacia.

20 El efecto secundario más frecuente del raloxifeno y otros SERM (tal como el tamoxifeno) son los sofocos. Sin embargo, el raloxifeno y otros tratamientos sustitutivos con hormonas se ha visto que incrementan el riesgo de coágulos de sangre, entre ellos trombosis de vena profunda y embolia pulmonar, enfermedad cardiovascular y cáncer.

25 La calcitonina no es tan eficaz como los estrógenos y los otros fármacos que inhiben la osteoclasia a la hora de incrementar la densidad ósea ni de fortalecer el hueso. Los efectos secundarios habituales de la calcitonina inyectada o de pulverización nasal son las náuseas y la irritación cutánea. Los pacientes pueden sufrir irritaciones nasales, rinorrea o epistaxis. La calcitonina inyectable puede provocar enrojecimiento de la piel en el sitio de la inyección, exantema e irritación cutánea.

30 Una situación que demuestra la conexión entre varios trastornos o estados patológicos que afectan la remodelación ósea es la del uso del ácido etidróico (Didronel) autorizado por primera vez por la FDA para tratar la enfermedad de Paget. La enfermedad de Paget es una osteopatía caracterizada por una remodelación desordenada y acelerada del hueso, que conduce a debilidad ósea y dolor. El Didronel se ha utilizado para indicaciones no autorizadas y en algunos estudios se demostró que incrementa la densidad ósea de las mujeres que sufren osteoporosis tras la menopausia. También se ha encontrado que es eficaz para la prevención de la osteopenia en los pacientes que requieren fármacos esteroideos a largo plazo (tal como prednisona o cortisona). Sin embargo, el uso continuo o en dosis elevadas del Didronel puede ocasionar otra osteopatía llamada osteomalacia. Al igual que la osteoporosis, la osteomalacia puede conducir a la debilitación de los huesos con un incremento del riesgo de fracturas. Debido al problema de la osteomalacia y a que todavía no hay suficientes estudios sobre la reducción en la tasa de fracturas óseas, la FDA de los Estados Unidos no ha autorizado el Didronel para el tratamiento de la osteoporosis.

35 El tratamiento de la osteoporosis se ha centrado en gran medida en los fármacos inhibidores de la osteoclasia que reducen la tasa de osteopenia, pero los nuevos tratamientos son prometedores al incrementar la densidad mineral ósea en vez de simplemente mantenerla o entretener su pérdida. Las primeras estrategias de la osteoporosis consisten en buena parte en fármacos candidatos de nuevas clases terapéuticas, en particular, inhibidores de la catepsina K, osteoprotegerina y calcilíticos, así como nuevos bisfosfonatos. Algunos de ellos son ejemplos en donde 40 los programas de genómica que explotan nuevos fármacos se están desarrollando basándose en un conocimiento más profundo de la biología del hueso y tienen el potencial de cambiar las esperanzas de tratamiento de los trastornos óseos a largo plazo.

45 Por consiguiente, existe la necesidad de conocer mejor el proceso de remodelación ósea y proporcionar nuevas composiciones que son útiles para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento, prevención y evaluación de tratamientos para la remodelación ósea y los trastornos asociados. Se ha desarrollado un procedimiento para analizar los patrones de expresión de polinucleótidos y se ha aplicado para identificar polinucleótidos, polipéptidos, variantes y derivados implicados específicamente en la remodelación ósea.

55 La presente invención busca satisfacer éstas y otras necesidades.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que se utiliza en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de osteopatías, que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 a) SEQ ID n.º 48,
b) un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 1,
c) un fragmento de uno cualquiera de a) o b) que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos, y
10 d) un análogo de uno cualquiera de a) o b) que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos, en donde dicho análogo tiene una similitud de secuencia de al menos el 90 % con el polipéptido de a) o b),
y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que se utiliza en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de osteopatías, en donde la composición farmacéutica comprende un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 a) un polinucleótido que comprende la SEQ ID n.º 1,
b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de los nucleótidos 150 a 1136 de la SEQ ID n.º 1,
c) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a a) al menos al 80 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
20 d) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a b) al menos al 80 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
e) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a a) al menos al 80 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido, y
f) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a b) al menos al 90 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
25 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polinucleótido que comprende la SEQ ID n.º 1,
b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de los nucleótidos 150 a 1136 de la SEQ ID n.º 1,
30 c) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a a) al menos al 80 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
d) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a b) al menos al 90 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
e) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a a) al menos al 80 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido, y
35 f) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a b) al menos al 90 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,

para el uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de osteopatías.

- 40 La presente invención también se refiere a un polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID n.º 48,
b) un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 1,
c) un fragmento de uno cualquiera de a) o b) que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos, y

d) un análogo de uno cualquiera de a) o b) que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos, en donde dicho análogo tiene una similitud de secuencia de al menos el 90 % con el polipéptido de a) o de b),

para el uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de osteopatías.

5 La presente invención también se refiere a un compuesto capaz de interferir con la actividad o la expresión de un polipéptido seleccionado entre SEQ ID n.º 48 o un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 1 para el uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de osteopatías, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos o fragmentos fijadores de antígeno de los mismos que se fijan específicamente a un polipéptido seleccionado entre SEQ ID n.º 48 o un
10 fragmento de la misma, y siRNA o shRNA que inhiben específicamente la actividad o expresión de un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 1. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado o fragmento fijador de antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el fragmento fijador de antígeno es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento F_v.

15 La invención también se refiere al uso de un polinucleótido aislado, polipéptido aislado o compuesto como se define más arriba en la fabricación de un medicamento para la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, para la prevención de osteopatías o para el tratamiento de osteopatías.

La invención también se refiere al uso de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

a) un polinucleótido que comprende la SEQ ID n.º 1;

b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de los nucleótidos 150 a 1136 de la SEQ ID n.º 1;

20 c) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a a) al menos al 80 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido;

d) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a b) al menos al 90 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,

25 e) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a a) al menos al 80 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido, y

f) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a b) al menos al 90 % a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,

en el diagnóstico in vitro de una osteopatía.

30 La presente invención también se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto inhibidor capaz de alterar la expresión o la actividad de un polipéptido de SEQ ID n.º 48, o un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 1, en donde el procedimiento comprende poner en contacto dicho polipéptido o una célula que expresa dicho polipéptido con un compuesto candidato y medir la expresión o la actividad de dicho polipéptido, por medio de lo cual un compuesto inhibidor adecuado se identifica positivamente por una reducción de la capacidad del polipéptido para favorecer la diferenciación de los osteoclastos. Tal procedimiento puede comprender adicionalmente una etapa de inducción de la
35 diferenciación de los osteoclastos cuando se pone en contacto dicho polipéptido o célula con un compuesto candidato.

En algunas realizaciones de la presente invención, la osteopatía se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercortisolismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos,
40 síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo, fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos y daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos.

En la presente memoria se dan a conocer polinucleótidos que comprenden secuencias implicadas en el proceso de la remodelación ósea, el marco abierto de lectura de tales secuencias, secuencias sustancialmente idénticas (p. ej., variantes [p. ej., variante alélica], ortólogos no humanos), secuencias sustancialmente complementarias y
45 fragmentos de una cualquiera de las mismas citadas anteriormente.

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende secuencias que intervienen en el proceso de remodelación ósea, entre ellas, análogos biológicamente activos y fragmentos biológicamente activos de las mismas. La presente invención también se refiere a composiciones que son útiles para el diagnóstico, pronóstico,
50 tratamiento, prevención y/o evaluación de tratamientos para la remodelación ósea y los trastornos asociados.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para analizar los patrones de expresión de polinucleótidos, y se aplica en la identificación de polinucleótidos, polipéptidos, variantes y derivados que intervienen específicamente en la remodelación ósea.

La presente descripción se refiere a los perfiles de expresión de polinucleótidos de los osteoclastos, el aislamiento y la identificación de polinucleótidos, sus polipéptidos correspondientes, variantes y derivados que intervienen en la actividad de los osteoclastos, la validación de estos elementos identificados por su potencial como dianas terapéuticas y el uso de dichos polinucleótidos, polipéptidos, variantes y derivados para la mejora de los estados patológicos.

Se dan a conocer en la presente memoria polinucleótidos y/o polipéptidos relacionados que se han aislado e identificado. Más específicamente, se dan a conocer en la presente memoria (aislados o sustancialmente purificados) polinucleótidos que comprenden o consisten en uno cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, su secuencia codificante (marco abierto de lectura), secuencia sustancialmente idéntica (p, ej, variantes, ortólogos [p. ej., SEQ ID n.º 35]), secuencias sustancialmente complementarias y polipéptidos relacionados que comprenden una cualquiera de SEQ ID n.º 48-80 y polipéptidos codificados por la SEQ ID n.º 85 o la SEQ ID n.º 86 que se ha demostrado que están inducidos de una forma muy específica en los osteoclastos. También se describen en la presente memoria análogos polipeptídicos, variantes (p. ej., SEQ ID n.º 81) y fragmentos de los mismos.

NSEQ se refiere de forma general a secuencias polinucleotídicas descritas en la presente memoria e incluye, por ejemplo, SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, mientras que PSEQ se refiere de forma general a secuencias polipeptídicas descritas en la presente memoria e incluye, por ejemplo, SEQ ID n.º 48 a 82 y polipéptidos codificados por la SEQ ID n.º 85 o la SEQ ID n.º 86. Por supuesto, se entenderá que NSEQ también abarca secuencias polinucleotídicas que están diseñadas o que proceden de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, por ejemplo, su secuencia codificante, secuencias complementarias, Ejemplos no limitantes de tales secuencias se describen en la presente memoria (p, ej., SEQ ID n.º 42-45).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «NSEQ» se refiere de forma general a las secuencias polinucleotídicas que comprenden o consisten en una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86 (p. ej., una forma aislada) o comprenden o consisten en un fragmento de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86. La terminología «NSEQ» se refiere más en concreto a una secuencia polinucleotídica que comprende o consiste en una porción transcrita de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86, que puede estar, por ejemplo, libre de porción o porciones sin traducir o intraducibles (a saber, una porción codificante de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86). La terminología «NSEQ» se refiere adicionalmente a una secuencia sustancialmente idéntica a una cualquiera de las anteriores y más en concreto sustancialmente idéntica a la secuencia polinucleotídica que comprende o consiste en una porción transcrita de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86, que puede estar, por ejemplo, libre de porción o porciones sin traducir o intraducibles. La terminología «NSEQ» se refiere adicionalmente a una región de la secuencia polinucleotídica de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86 que codifica o que es capaz de codificar un polipéptido. La terminología «NSEQ» también se refiere a una secuencia polinucleotídica capaz de codificar uno cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente memoria o un fragmento de polipéptido de uno cualquiera de los anteriores. Finalmente, la terminología «NSEQ» también comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una cualquiera de las anteriores.

La terminología «NSEQ inhibidora» por lo general se refiere a una secuencia sustancialmente complementaria a una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86, sustancialmente complementaria a un fragmento de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86, sustancialmente complementaria a una secuencia sustancialmente idéntica a las SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86 y, más en concreto, sustancialmente complementaria a una porción transcrita de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86 (p, ej., que puede estar sin la porción no traducida o intraducible) y que puede tener una acción atenuadora o incluso inhibidora de la transcripción de un mRNA o de la expresión de un polipéptido codificado por la correspondiente SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86. La «NSEQ inhibidora» idónea puede tener, por ejemplo y sin limitación, de unos 10 a unos 30 nucleótidos, de unos 10 a unos 25 nucleótidos, o de unos 15 a unos 20 nucleótidos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «nucleótido» significa desoxirribonucleótido o ribonucleótido. El uso de análogos de nucleótidos también está contemplado en la presente invención.

Los polinucleótidos pueden tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 100 % (p. ej., 80 %, 90 %, 95 %, etc.) con una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo que consiste en los polinucleótidos que comprenden (a) uno cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33 o SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86; (b) un marco abierto de lectura de (a); (c) un complemento completo de (a) o (b); (d) un fragmento de uno cualquiera de (a) a (c).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «región intraducible» puede incluir, por ejemplo, una región promotora (o porción de la misma), región silenciadora, región potenciadora, etc., de una secuencia polinucleotídica.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «región intraducible» puede incluir, por ejemplo, una porción iniciadora de una secuencia polinucleotídica (cadena arriba de un codón de iniciación, p. ej., AUG), regiones intrónicas, codón de parada y/o región cadena abajo de un codón de parada (incluida la cola de poliA, etc.).

Los complementos de la secuencia polinucleotídica aislada descritos en la presente memoria pueden ser los que, por ejemplo, se hibridan en condiciones de rigor alto a una cualquiera de las secuencias nucleotídicas en (a) o (b).

Las condiciones de rigor alto pueden comprender, por ejemplo, una reacción de hibridación a 65 °C en SSC a 5X, solución de Denhardt a 5X, SDS al 1% y DNA de esperma de salmón desnaturalizado a 100 µg/ml.

De acuerdo con la presente invención, la secuencia polinucleotídica puede utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades o trastornos que implican la remodelación ósea.

- 5 Los fragmentos de los polinucleótidos pueden utilizarse, por ejemplo, como sondas para determinar la presencia del polinucleótido aislado (o su complemento o fragmentos del mismo) en una muestra, célula, tejido, etc., para propósitos experimentales o para el propósito de diagnóstico de enfermedades o trastornos que implican la remodelación ósea.

- 10 También se describe en la presente memoria una combinación que comprende multitud de polinucleótidos (sustancialmente purificados y/o aislados). Los polinucleótidos se pueden coexpresar con uno o más genes conocidos por intervenir en la remodelación ósea. Además, los numerosos polinucleótidos se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en un polinucleótido que comprende (a) uno cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86; (b) un marco abierto de lectura de (a); (c) una secuencia polinucleotídica que comprende o consiste en una porción transcrita de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86 que puede estar, por ejemplo, libre de porción o porciones sin traducir o intraducibles; (d) una secuencia complementaria a una cualquiera de (a) a (c); (e) una secuencia que se hibrida en condiciones de rigor alto a una cualquiera de las secuencias nucleotídicas de (a) a (d); y (f) fragmentos de uno cualquiera de (a) a (e).

- 20 También se describe en la presente memoria un polinucleótido que codifica uno cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente memoria. El polinucleótido (RNA, DNA, etc.) puede codificar un polipéptido que se puede seleccionar del grupo que consiste en uno cualquiera de SEQ ID n.º 48 a 80, polipéptidos codificados por la SEQ ID n.º 85 u 86, análogos o fragmentos de los mismos (p. ej., fragmentos biológicamente activos, fragmentos inmunológicamente activos, etc.).

- 25 También se describe en la presente memoria una molécula aislada de ácido nucleico que comprende los polinucleótidos descritos en la presente memoria, unida operativamente a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido heterólogo mediante lo cual se codifica un polipéptido de fusión.

- 30 También se describe en la presente memoria un polipéptido codificado por un polinucleótido de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86 o más en concreto del marco abierto de lectura de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, o una porción de las mismas. También se describe en la presente memoria el producto de un gen que se coexpresa con uno o más genes que se sabe que están implicados en la remodelación ósea.

- 35 En la presente memoria también se describe una variante alélica aislada que se produce de forma natural, así como variantes sintéticas (p. ej., hechas mediante tecnología de DNA recombinante o mediante síntesis química, etc.), tal como una variante biológicamente activa que puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos (en comparación con un polipéptido que se produce de forma natural), tal como una sustitución de aminoácido conservativa o no conservativa.

- 40 Además se da a conocer un vector (de mamífero, bacteriano, vírico, etc.) que comprende los polinucleótidos descritos en la presente memoria o fragmentos de los mismos, tal como un vector de expresión. El vector puede comprender adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que puede ayudar a la regulación de la expresión del polinucleótido y/o una secuencia nucleotídica que codifica una etiqueta (p. ej., etiqueta de afinidad; HA, GST, His, etc).

En la presente memoria se describe un vector de expresión que puede comprender, por ejemplo, los elementos siguientes unidos operativamente:

- a) un promotor de transcripción;
- 45 b) un segmento polinucleotídico (que puede comprender un marco abierto de lectura de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86); y
- c) un terminador de transcripción.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que comprende un polinucleótido descrito en la presente memoria, una célula hospedadora transformada con el vector de expresión y un procedimiento para producir un polipéptido de la presente invención.

- 50 También se describe en la presente memoria un vector que comprende un polinucleótido o fragmento polinucleotídico. Los vectores que pueden comprender una secuencia sustancialmente complementaria a los polinucleótidos descritos en la presente memoria (p. ej., siRNA, shRNA) están, por lo tanto, abarcados por la presente memoria. El vector puede comprender secuencias que permiten la transcripción del polinucleótido o fragmento polinucleotídico.

Se da a conocer en la presente memoria una célula que puede estar genéticamente modificada para que contenga y/o exprese el polinucleótido (entre ellos, complementos y fragmentos) y/o polipéptidos de la presente invención. La célula puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula bacteriana, etc.

5 Por consiguiente, en la presente memoria se da a conocer una célula hospedadora que puede comprender un vector como el descrito en la presente memoria. La célula puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de insecto, una bacteria, etc. La célula puede ser capaz de expresar o expresa un polipéptido codificado por el polinucleótido descrito en la presente memoria.

10 Los procedimientos para producir los polipéptidos abarcados por este documento incluyen, por ejemplo, cultivar la célula en condiciones que permiten la transcripción de un gen o la expresión del polipéptido. El polipéptido se puede recuperar, por ejemplo, del lisado de células o del sobrenadante de las células.

15 En la presente memoria se describe el uso de al menos un polinucleótido que comprende uno cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, su secuencia codificante, secuencias sustancialmente idénticas, secuencias sustancialmente complementarias o fragmentos de las mismas, en una matriz ordenada. La matriz puede utilizarse en un procedimiento para diagnosticar una enfermedad o trastorno de remodelación ósea mediante la hibridación de la matriz con una muestra del paciente en condiciones que permiten la formación de complejos, detectar la formación de los complejos, y comparar la cantidad de complejos formados en la muestra del paciente con la de los estándares para tejidos normales y enfermos, en donde la formación de complejos en la muestra del paciente indica la presencia de una enfermedad o trastorno de remodelación ósea. Por supuesto, el uso de un polinucleótido descrito en la presente memoria en un método de diagnóstico no depende exclusivamente de la consecución de un ensayo específico. La secuencia o secuencias pueden utilizarse en los métodos de diagnóstico utilizados convencionalmente conocidos en la técnica.

20 También se describe un procedimiento para mejorar los síntomas de la enfermedad o trastorno de remodelación ósea, o para inhibir o retrasar la enfermedad o trastorno óseo, en donde el procedimiento puede comprender: poner en contacto un compuesto capaz de inhibir específicamente la actividad o la expresión de una secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria o un polipéptido descrito en la presente memoria, en los osteoclastos, de tal forma que se puedan mejorar los síntomas de la enfermedad o trastorno de remodelación ósea, o se puede prevenir, retrasar o disminuir la enfermedad o trastorno.

25 También se describe un procedimiento para mejorar los síntomas de la enfermedad o trastorno de remodelación ósea, o para inhibir o retrasar la enfermedad o trastorno óseo, en donde el procedimiento puede comprender: poner en contacto un compuesto capaz de favorecer específicamente la actividad o la expresión de una secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria o un polipéptido descrito en la presente memoria, en los osteoclastos, de tal forma que se pueden mejorar los síntomas de la enfermedad o trastorno de remodelación ósea, o se puede prevenir, retrasar o disminuir la enfermedad o trastorno.

30 También se describe un procedimiento para tratar una afección en un mamífero, que se caracteriza por la falta, o la necesidad, de crecimiento o reemplazo del hueso y/o un nivel indeseable de osteoclasia, en donde dicho procedimiento puede comprender la administración, a un sujeto mamífero que necesita tal tratamiento, de una cantidad eficaz de un compuesto adecuado que se describe en la presente memoria.

35 También se describe un procedimiento para utilizar una secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria, un polipéptido descrito en la presente memoria en una matriz, y para el uso de la matriz en un procedimiento para diagnosticar una enfermedad o trastorno de remodelación ósea mediante la hibridación de la matriz con una muestra del paciente en condiciones que permiten la formación de complejos, detección de los complejos formados, y la comparación de la cantidad de complejos formados en la muestra del paciente con la de los estándares para tejidos normales y enfermos, en donde la formación de complejos en la muestra del paciente puede indicar la presencia de una enfermedad o trastorno de remodelación ósea.

40 La secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria se puede utilizar para la genoterapia de células somáticas o para la genoterapia de células madre.

También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido descrito en la presente memoria o un polipéptido codificado por el polinucleótido seleccionado o porción del mismo, y un vehículo farmacéutico adecuado.

45 También se describen en la presente memoria productos, composiciones, procedimientos y métodos que comprenden un polinucleótido descrito en la presente memoria, un polipéptido codificado por los polinucleótidos, una porción de los mismos, sus variantes o derivados, para la investigación y para propósitos biológicos, clínicos y terapéuticos.

50 Las NSEQ y PSEQ pueden utilizarse en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento, prevención, y selección y evaluación de tratamientos de enfermedades y trastornos que implican la remodelación ósea, que incluyen pero sin limitarse a ellas, osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercortisolismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget,

enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo (incluido el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, y el dependiente de vitamina D de tipos I y II), fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos tal como picnodisostosis, y

5

Uso de NSEQ como una herramienta de escrutinio

Los polinucleótidos obtenidos en la presente memoria se pueden utilizar para detectar y aislar productos de expresión, por ejemplo, mRNA, los DNA complementarios (cDNA) y las proteínas procedentes de la NSEQ u homólogas a ella. En un ejemplo, la expresión de los mRNA homólogos a las NSEQ de la presente invención se puede detectar, por ejemplo, mediante análisis de hibridación, transcripción inversa y métodos de amplificación de ácidos nucleicos in vitro. Tales procedimientos permiten la detección de los mRNA en muchos tipos de tejidos o en diferentes etapas de desarrollo. Los ácidos nucleicos en cuestión que se expresan de una manera específica de tejido o de una manera específica de la etapa de desarrollo son útiles como marcadores específicos de tejido o para definir la etapa de desarrollo de una muestra de células o tejidos que pueden definir un estado patológico concreto. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente las NSEQ para estos propósitos.

10

15

Los expertos en la técnica también reconocerán que las NSEQ, y sus productos de expresión tales como ácidos nucleicos de cDNA y DNA genómico, pueden utilizarse para preparar secuencias oligonucleotídicas cortas. Por ejemplo, los oligonucleótidos que tienen de diez a doce nucleótidos o más se pueden preparar para que se hibriden específicamente a las NSEQ y los cDNA presentes, y permiten la detección, identificación y aislamiento de secuencias de ácido nucleico únicas por hibridación. Las secuencias de, por ejemplo, al menos 15 a 20 nucleótidos, pueden utilizarse y seleccionarse en regiones que carecen de homología con otras secuencias conocidas. Las secuencias de 20 o más nucleótidos que carecen de tal homología muestran un incremento de la especificidad por la secuencia diana. Las condiciones de hibridación útiles para sondas y cebadores son determinables fácilmente por los expertos en la técnica. Las condiciones de hibridación rigurosas abarcadas por esta memoria son las que pueden permitir la hibridación de ácidos nucleicos que tienen una homología de más del 90%, pero que pueden impedir la hibridación de los ácidos nucleicos cuya homología está por debajo del 70%. La especificidad de una sonda puede determinarse averiguando si está diseñada de una región única, de una región reguladora o de un motivo conservado. Tanto la especificidad de la sonda como el rigor de la hibridación diagnóstica o de las reacciones de amplificación (máxima, alta, intermedia o baja) se pueden determinar en función de si la sonda identifica exactamente las secuencias complementarias, las variantes alélicas o las secuencias relacionadas. Las sondas diseñadas para detectar las secuencias relacionadas pueden tener una identidad de secuencia de al menos el 50% con uno cualquiera de los polinucleótidos seleccionados.

20

25

30

Se debe entender en la presente memoria que las NSEQ (secuencias sustancialmente idénticas y fragmentos de las mismas) pueden hibridarse a una secuencia sustancialmente complementaria encontrada en una muestra problema. Adicionalmente, una secuencia sustancialmente complementaria a la NSEQ puede fijarse a la NSEQ encontrada en una muestra problema.

35

Además, una sonda puede marcarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la incorporación de nucleótidos unidos a una «molécula indicadora». Una «molécula indicadora», tal y como se utiliza en la presente memoria, puede ser una molécula que proporciona una señal identificable por medios analíticos que permite la detección de una sonda hibridada. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. Las moléculas indicadoras utilizadas con más frecuencia incluyen fluoróforos, enzimas, biotina, moléculas quimioluminiscentes, moléculas bioluminiscentes, digoxigenina, avidina, estreptavidina o radioisótopos. Las enzimas utilizadas con más frecuencia incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y β -galactosidasa, entre otras. Las enzimas pueden estar conjugadas con avidina o estreptavidina para utilizarlas con una sonda biotilada. De igual forma, las sondas pueden estar conjugadas con avidina o estreptavidina para utilizarlas con una enzima biotilada. La incorporación de una molécula indicadora en una sonda de DNA puede ser mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, traslado de mella, extensión de cebador, cebado aleatorio con oligonucleótidos, mediante la marcación en el extremo 3' o 5' o mediante otros medios. Además, las sondas de hibridación incluyen la clonación de secuencias de ácido nucleico en vectores para la producción de sondas de mRNA. Tales vectores se conocen en la técnica, están disponibles en el mercado y pueden utilizarse para sintetizar sondas de RNA in vitro. Las secuencias polinucleotídicas marcadas pueden utilizarse en análisis de tipo Southern o Northern, transferencia puntiforme u otras tecnologías a base de membranas; en tecnologías de PCR; y en micromatrices que utilizan muestras de sujetos para detectar cualquier alteración de la expresión. Los oligonucleótidos útiles como sondas para escrutar muestras mediante ensayos de hibridación o como cebadores para la amplificación se pueden envasar en forma de kits. Tales kits pueden contener las sondas o cebadores en una cantidad previamente medida o determinada, así como otros reactivos y material envasados convenientemente que son necesarios para el protocolo concreto de hibridación o de amplificación. En otra realización, la invención comporta un polipéptido sustancialmente purificado codificado por los polinucleótidos de NSEQ, análogos polipeptídicos o fragmentos polipeptídicos de los mismos. Los polipéptidos, bien en una forma premadura, madura o fusionada, se pueden aislar a partir de células lisadas, o a partir del medio de cultivo, y purificarse lo necesario para usarlo tal y como se diseñó. El experto en la técnica puede purificar con facilidad estas proteínas, polipéptidos y péptidos mediante cualquier procedimiento disponible. Por ejemplo, la purificación se puede

45

50

55

60

llevar a cabo mediante fraccionamiento con sales, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa, cromatografía de afinidad y similares.

Uso de la NSEQ para el desarrollo de un sistema de expresión

5 Para expresar un polipéptido biológicamente activo, la NSEQ o los derivados de la misma se pueden introducir en un vector de expresión, a saber, un vector que contiene los elementos para el control transcripcional y traduccional de la secuencia codificante insertada en un hospedador concreto. Estos elementos pueden incluir secuencias reguladoras, tales como potenciadores, promotores constitutivos e inducibles, y regiones sin traducir en 5' y 3'. Los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse para construir tales vectores de expresión. Estos procedimientos incluyen técnicas de DNA recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinação genética in vivo.

15 Para expresar la NSEQ se pueden utilizar numerosos sistemas de vector de expresión/células hospedadoras conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de DNA en bacteriófagos recombinantes, en plásmidos o en cósmidos; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de baculovirus; sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión víricos o bacterianos; o sistemas de células de animales. Para la producción a largo plazo de proteínas recombinantes en los sistemas de mamíferos, puede efectuarse la expresión estable en las líneas celulares. Por ejemplo, la NSEQ se puede introducir por transformación en las líneas celulares mediante vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación víricos y/o elementos de expresión endógena y un gen marcador de selección o de visibilidad en el mismo vector o en otro distinto. La descripción no estará limitada por el vector o la célula hospedadora empleada.

25 En general, las células hospedadoras que contienen la NSEQ y que expresan un polipéptido codificado por la NSEQ, o una porción del mismo, se pueden identificar mediante muchos procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitarse a ellos, hibridaciones de DNA-DNA o DNA-RNA, amplificación por PCR, y bioensayo de proteínas o técnicas de inmunoensayo que incluyen tecnologías basadas en membranas, en soluciones o en chip para detectar y/o cuantificar secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos. Se conocen bien en la técnica los métodos inmunitarios para detectar y medir la expresión de los polipéptidos con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos. Ejemplos de tales técnicas incluyen inmunoensayos enzimáticos (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) y clasificación de células activadas con fluorescencia (FACS). Los expertos en la técnica pueden adaptar con facilidad estas metodologías a la presente invención.

30 En la presente memoria se describe un bioensayo para evaluar compuestos que sean antagonistas en potencia del polipéptido descrito en la presente memoria, pudiendo comprender el bioensayo:

35 a) el cultivo de células problema en un medio de cultivo que contiene concentraciones crecientes de al menos un compuesto cuya capacidad para inhibir la acción de un polipéptido descrito en la presente memoria se pretende determinar, en donde las células problema pueden contener una secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria (por ejemplo, en una forma que mejora la actividad de transcripción por transactivación respecto al polinucleótido de tipo silvestre, y que comprende un elemento de respuesta unido operativamente a un gen indicador); y después

40 b) la monitorización del nivel de expresión del producto del gen indicador en las células como reflejo de la concentración del posible compuesto antagonista en el medio de cultivo, con lo que se indica la capacidad del posible compuesto antagonista para inhibir la activación del polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria.

45 También se describe en la presente memoria un bioensayo para evaluar compuestos que sean posibles agonistas para un polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria, pudiendo comprender el bioensayo:

50 a) el cultivo de las células problema en un medio de cultivo que contiene concentraciones crecientes de al menos un compuesto cuya capacidad para favorecer la acción del polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria se pretende determinar, en donde las células problema pueden contener una secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria (por ejemplo, en una forma que mejora la actividad de transcripción por transactivación respecto al polinucleótido de tipo silvestre, y que comprende un elemento de respuesta unido operativamente a un gen indicador); y después

55 b) la monitorización del nivel de expresión del producto del gen indicador en las células como reflejo de la concentración del posible compuesto agonista en el medio de cultivo, con lo cual se indica la capacidad del posible compuesto agonista para favorecer la activación de un polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria.

Las células hospedadoras transformadas con la NSEQ se pueden cultivar en condiciones que permitan la expresión y recuperación del polipéptido a partir del cultivo celular. El polipéptido producido por una célula transgénica puede

5 ser secretado por la célula o quedar retenido dentro de ella según la secuencia y/o el vector utilizados. Como
 10 conocerán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen la NSEQ pueden diseñarse para que
 15 contengan secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido a través de una membrana de una célula
 20 procarionta o eucariota. Debido a la degeneración inherente del código genético, otras secuencias de DNA que
 25 codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos o una funcionalmente equivalente pueden ser
 30 producidas y utilizadas para expresar el polipéptido codificado por la NSEQ. Las secuencias nucleotídicas descritas
 35 en la presente memoria se pueden modificar genéticamente con los procedimientos conocidos de forma general en
 40 la técnica para alterar las secuencias nucleotídicas para numerosos propósitos, que incluyen, a título nominativo y no
 45 exclusivo, la modificación de la clonación, procesamiento y/o expresión del producto génico. El barajado del DNA
 50 mediante fragmentación aleatoria y el reensamblaje por PCR de los fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos
 55 puede utilizarse para construir secuencias nucleotídicas. Por ejemplo, la mutagénesis específica de sitio mediante
 oligonucleótidos se puede utilizar para introducir mutaciones que crean nuevos sitios de restricción, alterar los
 patrones de glucosilación, cambiar la preferencia de los codones, producir variantes de ajuste, etcétera.

Además, se puede elegir una cepa de célula hospedadora por su capacidad para modular la expresión de las
 secuencias insertadas o para procesar el polipéptido expresado en la forma deseada. Tales modificaciones del
 polipéptido incluyen, a título nominativo y no exclusivo, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación,
 lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional, que escinde una forma «prepro» del polipéptido, también
 puede utilizarse para especificar la destinación, el plegamiento y/o la actividad de las proteínas. En el mercado y en
 la American Type Culture Collection (ATCC) se pueden conseguir diferentes células hospedadoras (p. ej., CHO,
 HeLa, MDCK, HEK293 y W138) que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para
 actividades postraduccionales y se pueden elegir para asegurarse la modificación y el procesamiento correctos del
 polipéptido expresado.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que las secuencias de ácido nucleico naturales, modificadas o
 recombinantes pueden estar ligadas a una secuencia heteróloga que da lugar a la traducción de un polipéptido de
 fusión que contiene restos de polipéptido heterólogo en cualquiera de los sistemas hospedadores antes
 mencionados. Tales restos de polipéptido heterólogo pueden facilitar la purificación de los polipéptidos de fusión con
 las matrices de afinidad disponibles en el mercado. Tales restos incluyen, a título nominativo y no exclusivo, glutatión
 S-transferasa (GST), proteína fijadora de maltosa, tiorredoxina, péptido fijador de calmodulina, 6-His (His), FLAG, c-
 myc, hemaglutinina (HA) y epitopos de anticuerpos monoclonales.

También se describe en la presente memoria un polinucleótido aislado que puede comprender una secuencia
 nucleotídica que codifica una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión puede comprender un compañero de
 fusión fusionado a un fragmento peptídico de una proteína codificada por la secuencia polinucleotídica descrita en la
 presente memoria, o un polipéptido de una variante alélica que se produce de forma natural codificado por la misma.

Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que las secuencias de ácido nucleico y polipeptídicas pueden
 sintetizarse, por completo o en parte, mediante procedimientos químicos o enzimáticos bien conocidos en la
 técnica. Por ejemplo, la síntesis peptídica puede realizarse con diferentes técnicas en fase sólida y máquinas tales
 como el sintetizador de péptidos ABI 431A (PE Biosystems), que puede utilizarse para automatizar la síntesis. Si se
 desea, la secuencia de aminoácidos puede alterarse durante la síntesis y/o combinarse con secuencias de otras
 proteínas para producir una proteína variante.

40 Uso de la NSEQ como una herramienta de escrutinio para diagnóstico

El experto en la técnica reconocerá con facilidad que la NSEQ puede utilizarse para propósitos diagnósticos en la
 determinación de la ausencia, presencia o expresión alterada (a saber, incremento o disminución en comparación
 con lo normal) del gen. Los polinucleótidos pueden tener una longitud de al menos 10 nucleótidos o una longitud de
 al menos 12 nucleótidos o una longitud de al menos 15 nucleótidos hasta cualquier longitud deseada, y pueden
 comprender moléculas de DNA y RNA complementarias, ácidos nucleicos ramificados, y/o ácidos peptidonucleicos
 (PNA). En una alternativa, los polinucleótidos pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión génica en
 muestras cuya expresión de NSEQ se correlaciona con la enfermedad. En otra alternativa, la NSEQ puede utilizarse
 para detectar los polimorfismos genéticos asociados a una enfermedad. Estos polimorfismos pueden detectarse en
 el cDNA transcrito.

En la presente memoria se da a conocer el uso de al menos un polinucleótido que comprende la NSEQ (p. ej., un
 marco abierto de lectura de la NSEQ, una secuencia sustancialmente complementaria, una secuencia
 sustancialmente idéntica, y fragmentos de la misma) en una matriz y el uso de tal matriz en un procedimiento
 diagnóstico para una enfermedad o trastorno de remodelación ósea mediante la hibridación de la matriz con una
 muestra del paciente en condiciones que permiten la formación de complejos, detectar la formación de complejos y
 comparar la cantidad de complejos formados en la muestra del paciente con la de los estándares para tejidos
 normales y enfermos, en donde la formación de complejos en la muestra del paciente indica la presencia de una
 enfermedad o trastorno de remodelación ósea.

También se da a conocer en la presente memoria uno o más kits compartimentados para la detección de estados
 patológicos de osteoclasia. Un primer kit puede tener un receptáculo que contiene al menos una sonda aislada. Tal

sonda puede ser un fragmento de ácido nucleico que está presente/ausente en el DNA genómico de las células normales, pero que está ausente/presente en el DNA genómico de las células afectadas. Tal sonda puede ser específica de un sitio de DNA que está normalmente activo/inactivo, pero que puede estar inactivo/activo en determinados tipos de células. De igual forma, tal sonda puede ser específica de un sitio de DNA que puede expresarse anormalmente en determinados tipos de células. Finalmente, tal sonda puede identificar una mutación específica en el DNA. Mediante específica de un sitio de DNA se quiere decir que la sonda puede ser capaz de hibridarse a la secuencia de DNA que está mutada, o que puede ser capaz de hibridarse a secuencias de DNA adyacentes a las secuencias de DNA mutadas. Las sondas proporcionadas en los kits presentes pueden tener una molécula indicadora unida covalentemente. Los expertos en la técnica serán capaces de preparar las sondas y moléculas indicadoras con facilidad tal y como está descrito más arriba.

Uso de la NSEQ como un tratamiento

El experto en la técnica apreciará fácilmente que los sistemas de expresión y ensayos explicados más arriba también pueden utilizarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico determinado, en estudios con animales, en ensayos clínicos, o para monitorizar el tratamiento de un paciente. Una vez que se establece la presencia de la enfermedad y se inicia un protocolo de tratamiento, se pueden repetir los ensayos de hibridación o amplificación con regularidad para determinar si el nivel de expresión en el paciente comienza a aproximarse al nivel observado en un sujeto sano. Los resultados obtenidos de ensayos sucesivos pueden utilizarse para mostrar la eficacia del tratamiento a lo largo de un tiempo que oscila de varios días a muchos años.

Aún en otro aspecto de la invención, una NSEQ, una porción de la misma, o su complemento, se puede utilizar terapéuticamente con el objeto de expresar mRNA y polipéptido, o al contrario, para bloquear la transcripción o traducción del mRNA. Los vectores de expresión se pueden construir con elementos de retrovirus, adenovirus, virus del herpes o virus de la vacuna, o plásmidos bacterianos, y similares. Estos vectores pueden utilizarse para administrar las secuencias nucleotídicas a un órgano, tejido o población de células diana particulares. Los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse para construir vectores para expresar las secuencias de ácido nucleico o sus complementos.

Alternativamente, la NSEQ, una porción de la misma, o su complemento, pueden utilizarse para la genoterapia con células somáticas o con células madre. Los vectores pueden introducirse in vivo, in vitro y ex vivo. Para el tratamiento ex vivo, los vectores se introducen en las células madre tomadas del sujeto, y las células transgénicas resultantes se propagan clonalmente para el trasplante autólogo de vuelta al mismo sujeto. El suministro de la NSEQ mediante transfección, inyecciones de liposomas o polímeros aminopolicatiónicos se puede conseguir mediante los procedimientos que se conocen bien en la técnica. Adicionalmente, la expresión endógena de la NSEQ se puede inactivar mediante procedimientos de recombinación homóloga que insertan una secuencia génica inactiva en la región codificante u otra región diana de la NSEQ.

Según el objetivo específico a conseguir, los vectores que contienen la NSEQ pueden introducirse en una célula o tejido para expresar un polipéptido ausente o para reemplazar un polipéptido que no funciona. Por supuesto, cuando se desea expresar la PSEQ en una célula o tejido, se puede utilizar una NSEQ capaz de codificar tal PSEQ para ese propósito o se puede administrar directamente la PSEQ a dicha célula o tejido.

Por otra parte, cuando se desea atenuar o inhibir la expresión de la PSEQ, se puede utilizar una NSEQ (p. ej., una NSEQ inhibidora) que es sustancialmente complementaria a al menos una porción de una NSEQ capaz de codificar tal PSEQ.

La expresión de una NSEQ inhibidora se puede realizar mediante la clonación de la NSEQ inhibidora en un vector y la introducción del vector en una célula para disminuir la expresión de un polipéptido codificado por la NSEQ diana.

Los vectores que contienen la NSEQ (p. ej., incluida la NSEQ inhibidora) se pueden transformar en una célula o tejido para expresar un polipéptido ausente o para reemplazar un polipéptido que no funciona. De igual forma, un vector construido para que exprese el complemento de la NSEQ se puede introducir por transformación en una célula para disminuir la sobreexpresión de un polipéptido codificado por los polinucleótidos de la NSEQ, o una porción de la misma. Las secuencias antisentido o complementarias pueden consistir en un oligonucleótido procedente del sitio de inicio de la transcripción; se prefieren los nucleótidos entre las posiciones aproximadamente -10 y +10 desde el ATG. De igual forma, la inhibición puede conseguirse con la metodología de apareamiento de bases en triple hélice. El apareamiento de la triple hélice es útil porque provoca la inhibición de la capacidad de la doble hélice para abrirse lo suficiente para que se fijen las polimerasas, los factores de transcripción o las moléculas reguladoras. Se han escrito en la bibliografía los avances terapéuticos recientes que utilizan el DNA triple (véase, p. ej., Gee et al., 1994).

Las ribozimas, moléculas de RNA con actividad enzimática, también pueden utilizarse para catalizar la escisión del mRNA y disminuir la cantidad de determinados mRNA, tales como los que comprenden las secuencias polinucleotídicas de la invención. Las ribozimas pueden escindir el mRNA en sitios de escisión específicos. Alternativamente, las ribozimas pueden escindir los mRNA en posiciones dictadas por las regiones flanqueantes que

forman pares de bases complementarias con el mRNA diana. La construcción y la producción de las ribozimas se conoce bien en la técnica.

5 Las moléculas de RNA se pueden modificar para incrementar la estabilidad intracelular y la semivida. Las modificaciones posibles incluyen, a título nominativo y no exclusivo, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos en 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2' O-metilo en vez de enlaces fosfodiéster dentro del esqueleto de la molécula. Alternativamente, se pueden añadir bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wibutosina, así como acetil-, metil-, tio- y formas modificadas de forma parecida, de adenina, citidina, guanina, timina y uridina que las endonucleasas endógenas no reconocen con facilidad.

10 Además de los ingredientes activos, una composición farmacéutica puede contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en la preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente.

15 Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente tanto mediante ensayos de cultivo de células como mediante modelos de animales tales como ratones, ratas, conejos, perros o cerdos. Un modelo de animal también puede utilizarse para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración. A continuación, tal información puede utilizarse para determinar las dosis útiles y las vías para la administración en los humanos. Estas técnicas las conoce bien el experto en la técnica y una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo que mejora los síntomas o la afección. La eficacia y la toxicidad terapéuticas se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos de células o con animales experimentales, tales como mediante el cálculo y la comparación estadística de la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). Cualquiera de las composiciones terapéuticas descritas más arriba se pueden aplicar a cualquier sujeto que necesite tal tratamiento, que incluye pero sin limitarse a ellos, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, lo más preferiblemente, humanos.

25 Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención se pueden administrar por muchas vías, que incluyen pero sin limitarse a ellas, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o rectal.

30 La terminología «Tratamiento» para los propósitos de esta descripción se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o retrasar (aliviar) el trastorno o la afección patológicos de interés. Los que necesitan tratamiento incluye a quienes ya padecen el trastorno así como a los propensos a padecer el trastorno o a los que hay que prevenir del trastorno.

Uso de la NSEQ en la investigación general

35 En la presente memoria se dan a conocer productos, composiciones, procedimientos y métodos que utilizan la NSEQ, su marco abierto de lectura o un polipéptido codificado por los polinucleótidos de la NSEQ o su marco abierto de lectura, o una porción del mismo, sus variantes, análogos, derivados y fragmentos para propósitos de investigación, biológicos, clínicos y terapéuticos. Por ejemplo, para identificar variantes de ajuste, mutaciones y polimorfismos.

40 La NSEQ se puede extender con una secuencia nucleotídica parcial y mediante diferentes procedimientos basados en la PCR conocidos en la técnica para detectar secuencias cadena arriba tal como los promotores y otros elementos reguladores. Adicionalmente, se puede utilizar un kit XL-PCR (PE Bioystems, Foster City, Calif.), cebadores anidados, y genotecas de cDNA disponibles en el mercado (Life Technologies, Rokville Md.) o genotecas genómicas (Clontech, Palo Alto, Calif.) para extender la secuencia.

45 Los polinucleótidos pueden también utilizarse como dianas en una micromatriz. La micromatriz se puede utilizar para monitorizar los patrones de expresión de una gran cantidad de genes simultáneamente y para identificar las variantes de ajuste, las mutaciones y los polimorfismos. La información procedente de los análisis de los patrones de expresión se puede utilizar para determinar la función génica, para conocer la base genética de una enfermedad, para diagnosticar una enfermedad, y para desarrollar y monitorizar las actividades de los fármacos terapéuticos utilizados para tratar la enfermedad. Las micromatrices también pueden utilizarse para detectar la diversidad genética, polimorfismos de un sólo nucleótido que pueden caracterizar una población concreta, a nivel genómico.

50 Aún en otro ejemplo, los polinucleótidos se pueden utilizar para generar sondas de hibridación útiles para mapear la secuencia genómica que aparece de forma natural. La hibridación fluorescente in situ (FISH, por su nombre en inglés) se puede correlacionar con otras técnicas de mapeo físico del cromosoma y datos del mapeo genético.

55 También se describe en la presente memoria un procedimiento para identificar representativamente una secuencia expresada diferencialmente de forma endógena implicada en la diferenciación de los osteoclastos. La secuencia se puede, por ejemplo, expresar diferencialmente en una célula de osteoclasto diferenciada en comparación con una célula precursora de osteoclasto sin diferenciar.

El procedimiento descrito en la presente memoria puede comprender:

- a) proporcionar por separado el RNA mensajero total de la célula de osteoclasto humano diferenciado (maduro o intermedio), en donde el RNA mensajero total puede comprender, por ejemplo, al menos una secuencia expresada diferencialmente de forma endógena,
- 5 b) generar cDNA monocatenario de cada RNA mensajero de la célula de osteoclasto humano diferenciado y (p. ej., aleatoriamente) etiquetar el extremo 3' del cDNA monocatenario con una secuencia promotora para la RNA polimerasa y una primera etiqueta de secuencia;
- c) generar cDNA monocatenario de cada RNA mensajero de la célula precursora de osteoclasto humano sin diferenciar y (p. ej., aleatoriamente) etiquetar el extremo 3' del cDNA monocatenario con una secuencia promotora para la RNA polimerasa y una segunda etiqueta de secuencia;
- 10 d) generar por separado DNA parcial o completamente bicatenario etiquetado en 5' de cada uno de b) y c), en donde el DNA bicatenario etiquetado en 5' puede, por lo tanto, comprender en una dirección de 5' a 3' un promotor bicatenario para la RNA polimerasa, una primera o segunda etiqueta de secuencia y una secuencia expresada de forma endógena,
- 15 e) amplificar linealmente por separado un primer y un segundo RNA sentido etiquetado de cada uno de d) con una enzima RNA polimerasa (que se puede seleccionar basándose en el promotor utilizado para etiquetar),
- f) generar un primer o segundo DNA etiquetado y monocatenario que es complementario a uno de e),
- g) hibridar el primer o segundo DNA etiquetado monocatenario y complementario de f) con el otro RNA sentido amplificado linealmente de e),
- 20 h) recuperar el RNA sin hibridar con la ayuda de la primera o segunda etiqueta de secuencia (por ejemplo, mediante PCR o hibridación); y
- i) identificar (determinar) la secuencia nucleotídica del RNA sin hibridar.

Las etapas b) y/o c) pueden comprender la generación de una única copia de un cDNA monocatenario.

- 25 El procedimiento puede además comprender la etapa de determinar comparativamente la presencia de la secuencia identificada de forma endógena y expresada diferencialmente en una célula de osteoclasto diferenciado respecto a una célula precursora de osteoclasto sin diferenciar.

Por consiguiente, se puede seleccionar una secuencia que está sustancialmente ausente (p. ej., totalmente ausente o presente en una cantidad muy baja) de uno de la célula de osteoclasto diferenciado o una célula precursora de osteoclasto sin diferenciar, y presente en la otra célula de osteoclasto diferenciado o una célula precursora de osteoclasto sin diferenciar.

- 30 Así pues, la secuencia seleccionada puede ser un regulador positivo de la diferenciación de los osteoclastos y, por lo tanto, puede representar una diana atractiva que se puede utilizar ventajosamente para favorecer la osteoclasia o alternativamente tal diana se puede inhibir para disminuir o impedir la osteoclasia.

- 35 Alternativamente, la secuencia seleccionada con el procedimiento anterior puede ser un regulador negativo de la diferenciación de los osteoclastos y puede, por consiguiente, representar una diana atractiva que se puede inducir ventajosamente (p. ej., a nivel de transcripción, traducción, actividad, etc.) o proporcionar a una célula para disminuir o impedir la osteoclasia. De igual forma, tal regulador negativo puede, tras su inhibición, servir de diana para favorecer la osteoclasia.

- 40 La secuencia puede, además, seleccionarse basándose en una expresión reducida o sustancialmente ausente en otro tejido normal, por lo que representa una secuencia candidata implicada específicamente en la diferenciación de los osteoclastos y la remodelación ósea.

El procedimiento puede también comprender además una etapa para determinar la secuencia completa de la secuencia nucleotídica y puede también comprender determinar la secuencia codificante de la secuencia nucleotídica.

- 45 También se describe en la presente memoria la secuencia (polinucleótido y polipéptido) aislada endógenamente y expresada diferencialmente que se identifica con el procedimiento descrito en la presente memoria.

- 50 También se describe en la presente memoria un polinucleótido que puede comprender la secuencia polinucleotídica identificada, un polinucleótido que puede comprender el marco abierto de lectura de la secuencia polinucleotídica identificada, un polinucleótido que puede comprender una secuencia nucleotídica sustancialmente idéntica al polinucleótido identificado por el procedimiento descrito en la presente memoria, un polinucleótido que puede comprender una secuencia nucleotídica sustancialmente complementaria al polinucleótido identificado por el procedimiento descrito en la presente memoria, fragmentos y variantes de ajuste del mismo, siempre y cuando la secuencia no consista en o comprenda la SEQ ID n.º 34.

La secuencia expresada diferencialmente y aislada endógenamente descrita en la presente memoria puede ser una molécula de RNA completa o parcial.

5 La molécula de DNA aislada capaz de transcribirse en la molécula de RNA descrita en la presente memoria también está abarcada por este documento, así como los vectores (entre ellos, los vectores de expresión) que comprenden tal molécula de DNA o RNA.

También se describen en la presente memoria genotecas que comprenden al menos una secuencia expresada diferencialmente y aislada endógenamente que se identifica con la presente memoria [p. ej., DNA o RNA parcial o completo, secuencias sustancialmente idénticas o secuencias sustancialmente complementarias (p. ej., sondas) y fragmentos de los mismos (p. ej., oligonucleótidos)].

10 La secuencia expresada diferencialmente y aislada endógenamente descrita en la presente memoria se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en un polinucleótido que puede consistir en o comprender:

a) una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86,

b) el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86,

c) un polinucleótido que puede comprender una secuencia nucleotídica sustancialmente idéntica a a) o b), y;

15 d) un polinucleótido que puede comprender una secuencia nucleotídica sustancialmente complementaria a una cualquiera de a) a c),

e) fragmentos de una cualquiera de a) a d).

También se describe en la presente memoria un polipéptido que puede ser codificado por la secuencia expresada diferencialmente y aislada endógenamente descrita en la presente memoria.

20 También se describe en la presente memoria un polinucleótido capaz de codificar un polipéptido descrito en la presente memoria. Debido a la degeneración del código genético, se debe comprender en la presente memoria que muchas secuencias polinucleotídicas pueden codificar la misma secuencia polipeptídica y, por lo tanto, están abarcadas por la presente memoria.

25 Los polipéptidos de ejemplo pueden comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cualquiera de SEQ ID n.º 48 a 80, un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 85 o la SEQ ID n.º 86.

También se describe en la presente memoria una secuencia polinucleotídica de ortólogo no humano aislada (implicada en la remodelación ósea), el marco abierto de lectura del ortólogo no humano, secuencias sustancialmente idénticas, secuencias sustancialmente complementarias, fragmentos y variantes de ajuste de las mismas.

30 También se describe en la presente memoria un polipéptido aislado codificado por el polinucleótido de ortólogo no humano, así como análogos biológicamente activos y fragmentos biológicamente activos de los mismos.

Las realizaciones de ejemplo de polinucleótidos de ortólogos no humanos (p. ej., ratón) abarcados por este documento incluyen, por ejemplo, la SEQ ID n.º 35.

Las realizaciones de ejemplo de polipéptido aislado codificado por algunos ortólogos no humanos identificados en la presente memoria incluyen, por ejemplo, un polipéptido tal como la SEQ ID n.º 82.

35 También se describe en la presente memoria un polinucleótido aislado que se puede expresar diferencialmente en la célula de osteoclasto diferenciado en comparación con la célula precursora de osteoclasto humano sin diferenciar.

El polinucleótido aislado puede comprender un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

a) un polinucleótido que puede comprender una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86.

40 b) un polinucleótido que puede comprender el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86;

c) un polinucleótido que puede comprender una porción transcrita o que se puede transcribir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, que puede estar, por ejemplo, libre de porción o porciones sin traducir o intraducibles;

45 d) un polinucleótido que puede comprender una porción traducida o traducible de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86 (p. ej., porción codificante),

e) un polinucleótido que puede comprender una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., una identidad de aproximadamente el 50 al 100 %, o aproximadamente del 60 al 100 % o aproximadamente del 70 al 100 % o

aproximadamente del 80 al 100 % o aproximadamente del 85, 90, 95 al 100 % a lo largo de toda la secuencia o de la porción de las secuencias) a a), b), c) o d),

5 f) un polinucleótido que puede comprender una secuencia sustancialmente complementaria (p. ej., complementaria de aproximadamente el 50 al 100 %, o aproximadamente del 60 al 100 % o aproximadamente del 70 al 100% o aproximadamente del 80 al 100% o aproximadamente del 85, 90, 95 al 100% a lo largo de toda la secuencia o de la porción de las secuencias) a a), b), c) o d); y

g) un fragmento de uno cualquiera de a) a f).

h) que incluye polinucleótidos que consisten en lo anterior.

10 Los fragmentos polinucleotídicos de ejemplo de los enumerados más arriba comprenden polinucleótidos de al menos 10 ácidos nucleicos que pueden ser sustancialmente complementarios a la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, por ejemplo, fragmentos seleccionados del grupo que consiste en una cualquiera de las SEQ ID n.º 42 a 45.

También se describe en la presente memoria un polinucleótido aislado implicado en la diferenciación de los osteoclastos, en donde el polinucleótido aislado puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en:

15 a) un polinucleótido que comprende una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86,

b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86,

20 c) un polinucleótido que puede comprender una porción transcrita o que se puede transcribir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, que puede estar, por ejemplo, libre de porción o porciones sin traducir o intraducibles;

d) un polinucleótido que puede comprender una porción traducida o traducible de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86 (p. ej., porción codificante),

e) un polinucleótido sustancialmente idéntico a a), b), c) o d); y

25 f) una secuencia de al menos 10 ácidos nucleicos que puede ser sustancialmente complementaria a la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86 o más en particular de a), b), c) o d).

De acuerdo con la presente invención, el polinucleótido aislado puede ser capaz de favorecer la diferenciación de los osteoclastos (p. ej., en un mamífero o en una célula de mamífero del mismo), esto es, puede ser un regulador positivo de la diferenciación de los osteoclastos.

30 En concordancia adicional con la presente invención, el polinucleótido aislado puede ser capaz de inhibir, prevenir o disminuir la diferenciación de los osteoclastos (p. ej., en un mamífero o en una célula de mamífero del mismo), esto es, puede ser un regulador negativo de la diferenciación de los osteoclastos.

35 Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que puede ser capaz de inhibir la diferenciación de los osteoclastos (p. ej., en un mamífero o en una célula de mamífero del mismo). El polinucleótido puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en polinucleótidos que pueden comprender una secuencia de al menos 10 ácidos nucleicos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las NSEQ descritas en la presente memoria.

Los polinucleótidos adecuados incluyen, por ejemplo, un polinucleótido que tiene o comprende los que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID n.º 42 a 45.

40 Los polinucleótidos adecuados pueden ser los que pueden ser capaces de inhibir la diferenciación de los osteoclastos que ha sido inducida por un inductor de la diferenciación de los osteoclastos, tal como los recogidos en la presente memoria.

De acuerdo con la presente invención, el polinucleótido puede ser, por ejemplo, una molécula de RNA, una molécula de DNA, incluidas las que son parciales o completas, monocatenarias o bicatenarias, híbridos, etc.

45 También se describe en la presente memoria un vector (p. ej., un vector de expresión) que comprende el polinucleótido de la presente invención.

50 También se describe en la presente memoria una genoteca de secuencias polinucleotídicas que se puede expresar diferencialmente en una célula de osteoclasto diferenciado en comparación con una célula precursora de osteoclasto sin diferenciar. La genoteca puede comprender, por ejemplo, al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polinucleótido que puede comprender una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86,
- b) un polinucleótido que puede comprender el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86,
- 5 c) un polinucleótido que puede comprender una porción transcrita o que se puede transcribir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, que puede estar, por ejemplo, libre de porción o porciones sin traducir o intraducibles;
- d) un polinucleótido que puede comprender una porción traducida o traducible de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86 (p. ej., porción codificante),
- 10 e) un polinucleótido que puede comprender una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., una identidad de aproximadamente el 50 al 100 %, o aproximadamente del 60 al 100 % o aproximadamente del 70 al 100 % o aproximadamente del 80 al 100 % o aproximadamente del 85, 90, 95 al 100 % a lo largo de toda la secuencia o de la porción de las secuencias) a a), b), c) o d);
- 15 f) un polinucleótido que puede comprender una secuencia sustancialmente complementaria (p. ej., complementaria de aproximadamente el 50 al 100 %, o aproximadamente del 60 al 100 % o aproximadamente del 70 al 100 % o aproximadamente del 80 al 100 % o aproximadamente del 85, 90, 95 al 100 % a lo largo de toda la secuencia o de la porción de las secuencias) a a), b), c) o d); y
- g) un fragmento de una cualquiera de a) a d).
- También se describe en la presente memoria una genoteca de expresión que puede comprender una genoteca de polinucleótidos descrita en la presente memoria. Cada polinucleótido puede estar contenido dentro de un vector de expresión.
- 20 Las matrices y kits que comprenden una genoteca de las secuencias polinucleotídicas (que comprenden al menos un polinucleótido tal como secuencias complementarias) descritas en la presente memoria también están abarcadas por el presente documento.
- También se da a conocer en la presente memoria una composición farmacéutica para inhibir la diferenciación de los osteoclastos (osteoclasia y enfermedades o trastornos relacionados con la osteoclasia), en donde la composición farmacéutica puede comprender, por ejemplo:
- 25 a) un polinucleótido aislado como se define en la presente memoria (p. ej., capaz de inhibir la diferenciación de los osteoclastos); y
- b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 También se describe en la presente memoria un procedimiento para inhibir la diferenciación de los osteoclastos (p. ej., para inhibir la osteoclasia o para mejorar la osteoclasia) en un mamífero (individuo) que lo necesita (o en una célula de mamífero), en donde el procedimiento puede comprender la administración de un polinucleótido aislado (p. ej., capaz de inhibir la diferenciación de los osteoclastos) o de una composición farmacéutica adecuada que comprende tal polinucleótido adecuado.
- 35 De acuerdo con la presente invención, el mamífero que lo necesita puede padecer, por ejemplo y sin limitación, una afección seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercortisolismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo (incluido el raquitismo dependiente de la vitamina D de tipos I y II, y el hipofosfatémico ligado al cromosoma X), fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos tal como picnodisostosis y daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos, etc.
- 40 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido aislado (p. ej., capaz de inhibir la diferenciación de los osteoclastos) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad osteoclástica.
- 45 La presente invención, en otro aspecto de la misma, da a conocer una composición farmacéutica para favorecer la diferenciación de los osteoclastos en un mamífero que lo necesita. La composición farmacéutica puede comprender, por ejemplo:
- 50 a. un polinucleótido aislado (p. ej., capaz de favorecer la diferenciación de los osteoclastos); y

b. un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para favorecer la diferenciación de los osteoclastos en un mamífero que lo necesita (o en una célula de mamífero), en donde el procedimiento puede comprender, por ejemplo, la administración de un polinucleótido aislado (p. ej., capaz de favorecer la diferenciación de los osteoclastos) o una composición farmacéutica adecuada como la descrita más arriba.

5

La presente invención se refiere adicionalmente al uso de un polinucleótido aislado (p. ej., capaz de favorecer la diferenciación de los osteoclastos) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a una osteoclasia insuficiente (p. ej., hiperostosis) o un excesivo crecimiento del hueso.

10

También se describe en la presente memoria el uso de al menos un polinucleótido que se puede seleccionar del grupo que consiste en:

a) un polinucleótido que comprende una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86,

b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86,

15

c) un polinucleótido que puede comprender una porción transcrita o que se puede transcribir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, que puede estar, por ejemplo, libre de la porción o porciones sin traducir o intraducibles;

d) un polinucleótido que puede comprender una porción traducida o traducible de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86 (p. ej., porción codificante),

20

e) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., una identidad de aproximadamente el 50 al 100 %, o aproximadamente del 60 al 100 % o aproximadamente del 70 al 100 % o aproximadamente del 80 al 100 % o aproximadamente del 85, 90, 95 al 100 % a lo largo de toda la secuencia o de la porción de las secuencias) a a), b), c) o d);

25

f) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente complementaria (p. ej., una complementariedad de aproximadamente el 50 al 100 %, o aproximadamente del 60 al 100 % o aproximadamente del 70 al 100 % o aproximadamente del 80 al 100 % o aproximadamente del 85, 90, 95 al 100 % a lo largo de toda la secuencia o de la porción de las secuencias) a a), b), c) o d);

g) un fragmento de una cualquiera de a) a f); y

h) una genoteca que comprende una cualquiera de a) a g)

en el diagnóstico de una afección relacionada con la remodelación ósea (una osteopatía).

30

También se describen en la presente memoria kits para el diagnóstico de una afección relacionada con la remodelación ósea. El kit puede comprender un polinucleótido como se describe en la presente memoria.

También se describe en la presente memoria un polipéptido aislado (secuencia polipeptídica) implicado en la diferenciación de los osteoclastos (en un mamífero o en una célula de mamífero del mismo). El polipéptido puede comprender (o consistir en) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

35

a) una cualquiera de SEQ ID n.º 48 a 80,

b) un polipéptido que puede estar codificado y/o está codificado por una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86 (su porción codificante),

c) un fragmento biológicamente activo de uno cualquiera de a) o b),

d) un análogo biológicamente activo de uno cualquiera de a) o b).

40

De acuerdo con la presente invención, el análogo biológicamente activo puede comprender, por ejemplo, al menos una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con la secuencia original. De acuerdo con la presente invención, el análogo puede comprender, por ejemplo, al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácido en su secuencia de aminoácidos.

45

La sustitución puede ser conservativa o no conservativa. El análogo polipeptídico puede ser un análogo biológicamente activo o un análogo inmunógeno que puede comprender, por ejemplo, al menos una sustitución de aminoácidos (conservativa o no conservativa), por ejemplo, 1 a 5, 1 a 10, 1 a 15, 1 a 20, 1 a 50, etc. (incluido cualquier número entre ellos) en comparación con la secuencia original. Un análogo inmunógeno puede comprender, por ejemplo, al menos una sustitución de aminoácido en comparación con la secuencia original y puede aún ser fijado por un anticuerpo específico contra la secuencia original.

De acuerdo con la presente invención, un fragmento polipeptídico puede comprender, por ejemplo, al menos 6 aminoácidos consecutivos, al menos 8 aminoácidos consecutivos o más, de una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria.

5 También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que puede comprender, por ejemplo, un polipéptido como se describe en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente memoria se dan a conocer procedimientos para modular la diferenciación de los osteoclastos en un mamífero que lo necesita (o en una célula de mamífero), en donde dichos procedimientos pueden comprender la administración de un polipéptido aislado (p. ej., capaz de favorecer la diferenciación de los osteoclastos) o una composición farmacéutica adecuada descrita en la presente memoria.

10 En otros aspectos, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido aislado (p. ej., capaz de favorecer la diferenciación de los osteoclastos) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a una osteoclasia insuficiente.

15 Los procedimientos para mejorar la osteoclasia en un individuo que los necesita también están abarcados por este documento, en donde dicho procedimiento puede comprender, por ejemplo, la administración de un polipéptido aislado (p. ej., capaz de inhibir la diferenciación de los osteoclastos) o de composiciones farmacéuticas adecuadas que pueden comprender tal polipéptido.

20 De acuerdo con la presente invención, el mamífero puede padecer, por ejemplo, una afección seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercortisolismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo (incluido el raquitismo dependiente de vitamina D de tipos I y II, y el hipofosfatémico ligado al cromosoma X), fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos tales como picnodisostosis y el daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos, etc.

25 Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido capaz de inhibir la diferenciación de los osteoclastos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de osteoclasia en un individuo que lo necesita.

30 También se describe en la presente memoria un compuesto y el uso de un compuesto capaz de inhibir (p. ej., en una célula precursora de osteoclasto) la actividad o expresión de un polipéptido que se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en SEQ ID n.º 48 a 80 o un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 85 o por la SEQ ID n.º 86, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una osteopatía en un individuo que lo necesita.

35 También se describe en la presente memoria un procedimiento para diagnosticar una afección relacionada con un trastorno o enfermedad osteoclástica en un individuo que lo necesita. El procedimiento puede comprender, por ejemplo, cuantificar un polinucleótido descrito en la presente memoria, tal como, por ejemplo, un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los que comprenden o consisten en (a) SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, (b) un polinucleótido que puede comprender el marco abierto de lectura de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, (c) un polinucleótido que puede comprender una porción transcrita o que se puede transcribir de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, (d) un polinucleótido que puede comprender una porción traducida o traducible de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, (e) secuencias sustancialmente idénticas a una cualquiera de (a) a (d); (f) secuencias sustancialmente complementarias a una cualquiera de (a) a (e), o una secuencia polipeptídica que se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en SEQ ID n.º 48 a 80 o un polipéptido codificado por SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86, y análogos de los mismos en una muestra del individuo en comparación con un valor estándar o normal.

45 También se describe en la presente memoria un ensayo y procedimiento para identificar un gen y/o proteína implicado en la remodelación ósea. El ensayo y procedimiento puede comprender silenciar un gen endógeno de una célula de osteoclasto y suministrar la célula con un gen (o proteína) candidato. Un gen (o proteína) candidato implicado positivamente en la remodelación ósea se puede identificar por su capacidad para complementar el gen endógeno silenciado. Por ejemplo, un gen candidato implicado en la diferenciación de los osteoclastos proporcionado a una célula en la cual se ha silenciado un gen endógeno puede permitir que la célula se diferencie en presencia de un inductor tal como, por ejemplo, RANKL.

55 También se describe en la presente memoria una célula que expresa una forma exógena de uno cualquiera de los polipéptidos (que incluyen variantes, análogos, etc.) o de los polinucleótidos de la presente invención (que incluyen secuencias sustancialmente idénticas, secuencias sustancialmente complementarias, fragmentos, variantes, ortólogos, etc.).

La célula puede ser, por ejemplo, un osteocito. La célula puede ser un osteoclasto (en cualquier nivel de diferenciación).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «forma exógena» se tiene que entender en la presente memoria como una forma que no se expresa de forma natural en la célula en cuestión.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo (p. ej., anticuerpo aislado), o fragmento de fijación al antígeno del mismo, que puede fijarse específicamente a una proteína o polipéptido descrito en la presente memoria. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo generado mediante las tecnologías de DNA recombinante. El anticuerpo se puede originar, por ejemplo, de ratón, de rata o de cualquier otro mamífero.

10 El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humano que se puede obtener, por ejemplo, de un mamífero no humano transgénico capaz de expresar los genes de Ig humana. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humanizado que puede comprender, por ejemplo, una o más regiones determinantes de complementariedad de origen no humano. También puede comprender un resto de superficie de un anticuerpo humano y/o regiones marco de un anticuerpo humano. El anticuerpo puede ser también un anticuerpo quimérico que puede comprender, por ejemplo, dominios variables de un anticuerpo no humano y dominios constantes de un anticuerpo humano.

15 Los anticuerpos adecuados pueden también incluir, por ejemplo, un fragmento fijador de antígeno, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fv; o un anticuerpo de cadena única que comprende un fragmento fijador de antígeno (p. ej., un Fv monocatenario).

El anticuerpo puede mutarse y seleccionarse basándose en un incremento de la afinidad y/o de la especificidad para uno de un polipéptido descrito en la presente memoria y/o basado en una reducción de la inmunogenia en un hospedador deseado.

20 El anticuerpo puede comprender adicionalmente un marcador detectable unido a éste.

En la presente memoria se describe un procedimiento para producir anticuerpos capaces de fijarse a uno de un polipéptido, fragmentos polipeptídicos o análogos polipeptídicos descritos en la presente memoria, pudiendo comprender el procedimiento:

25 a) inmunizar un mamífero (p. ej., ratón, un mamífero transgénico capaz de producir Ig humana, etc.) con una cantidad adecuada de una PSEQ descrita en la presente memoria que incluye, por ejemplo, un fragmento polipeptídico que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de una PSEQ;

b) recoger el suero de un mamífero; y

c) aislar los anticuerpos específicos contra el polipéptido que hay en el suero del mamífero.

El procedimiento puede además comprender la etapa de administrar una segunda dosis al animal.

30 También se describe en la presente memoria un procedimiento para producir un hibridoma que secreta un anticuerpo que se fija a un polipéptido descrito en la presente memoria, pudiendo comprender el procedimiento:

a) inmunizar un mamífero (p. ej., ratón, un mamífero transgénico capaz de producir Ig humana, etc.) con una cantidad adecuada de una PSEQ del mismo;

b) obtener linfocitos del animal inmunizado obtenido de (a);

35 c) fusionar los linfocitos con una célula inmortalizada para producir células híbridas; y

d) seleccionar las células híbridas que producen anticuerpos que se fijan específicamente a una PSEQ del mismo.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para producir un anticuerpo que se fija a uno del polipéptido descrito en la presente memoria, pudiendo comprender el procedimiento:

a) sintetizar una colección de anticuerpos (fragmento fijador del antígeno) en fagos o ribosomas;

40 b) escrutar repetidamente la colección contra una muestra poniendo en contacto el fago o los ribosomas con una composición que comprende un polipéptido o fragmento polipeptídico descrito en la presente memoria;

c) aislar el fago que se fija al polipéptido o fragmento polipeptídico; y

d) obtener un anticuerpo del fago o de los ribosomas.

45 El anticuerpo descrito en la presente memoria puede obtenerse así, por ejemplo, a partir de una genoteca (p. ej., genoteca en bacteriófagos) que se puede preparar, por ejemplo, mediante

a) extracción de las células que son responsables de la producción de anticuerpos en un mamífero hospedador;

b) aislamiento del RNA de las células de (a);

c) retrotranscripción del mRNA para producir cDNA;

d) amplificación del cDNA con un cebador (específico de anticuerpo); y

e) inserción del cDNA de (d) en un vector para visualización en fagos o casete de visualización en ribosomas de tal forma que los anticuerpos se expresan en el fago o en los ribosomas.

5 El animal hospedador se puede inmunizar con el polipéptido y/o un fragmento polipeptídico y/o análogo descrito en la presente memoria para inducir una respuesta inmunitaria antes de extraer las células que son responsables de la producción de los anticuerpos.

En la presente memoria se describe un kit para ensayar específicamente un polipéptido descrito en la presente memoria, en donde el kit puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse específicamente al polipéptido descrito en la presente memoria.

La presente invención contempla adicionalmente anticuerpos que pueden fijarse a la PSEQ. Los anticuerpos adecuados pueden fijarse a regiones antigénicas o epítomos únicos en los polipéptidos, o una porción de los mismos. Los epítomos y las regiones antigénicas útiles para generar anticuerpos se pueden hallar en el interior de las proteínas, polipéptidos o péptidos mediante los procedimientos disponibles para el experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden identificar secuencias peptídicas únicas y cortas en las proteínas y polipéptidos que tienen poca o ninguna homología con secuencias de aminoácidos conocidas. Preferiblemente, la región de una proteína seleccionada para que actúe como un epítomo o antígeno peptídico no es completamente hidrófoba; las regiones hidrófilas son preferibles porque estas regiones probablemente constituyen epítomos de superficie en vez de regiones internas de las proteínas y de los polipéptidos. Estos epítomos de la superficie se detectan más fácilmente en las muestras en las que se analizó la presencia de las proteínas y los polipéptidos. Tales anticuerpos pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y de una sola cadena, fragmentos Fab y fragmentos producidos mediante una genoteca de expresión de Fab. La producción de anticuerpos la conoce bien el experto en la técnica.

Los péptidos pueden fabricarse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, con el uso de los procedimientos de síntesis química o traducción in vitro. Los péptidos cortos que proporcionan un epítomo antigénico, pero que por sí mismos son demasiado pequeños para inducir una respuesta inmunitaria, pueden conjugarse a un vehículo adecuado. Los vehículos adecuados y los métodos de conexión se conocen bien en la técnica. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes tales como proteínas, polisacáridos y polímeros de aminoácidos. Los ejemplos incluyen seroalbúminas, hemocianina de lapa gigante (Megathura crenulata), ovalbúmina, polilisina y similares. El experto en la técnica puede utilizar los procedimientos disponibles y los reactivos de acoplamiento para conectar el epítomo peptídico deseado a tal vehículo. Por ejemplo, se pueden utilizar reactivos de acoplamiento para formar puentes disulfuro o enlaces tioéter desde el vehículo al péptido de interés. Si el péptido carece de un grupo disulfuro, se puede proporcionar uno mediante la adición de un resto de cisteína. Alternativamente, el acoplamiento se puede llevar a cabo mediante la activación de grupos carboxilo.

El tamaño mínimo de los péptidos útiles para obtener anticuerpos específicos de antígeno puede variar ampliamente. El tamaño mínimo debe ser suficiente para proporcionar un epítomo antigénico que es específico de la proteína o del polipéptido. El tamaño máximo no es crítico a menos que se desee obtener anticuerpos contra un epítomo concreto. Por ejemplo, un polipéptido grande puede comprender varios epítomos, un epítomo que es particularmente útil y un segundo epítomo que es inmunodominante. Típicamente, los péptidos antigénicos seleccionados entre las presentes proteínas y polipéptidos oscilarán de 5 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. Sin embargo, más típicamente, tal péptido antigénico tendrá un máximo de unos 50 aminoácidos de longitud y preferiblemente un máximo de unos 30 aminoácidos. Normalmente suele ser deseable seleccionar una secuencia de unos 6, 8, 10, 12 o 15 aminoácidos, hasta unos 20 o 25 aminoácidos.

Las secuencias de aminoácidos que comprenden epítomos útiles pueden identificarse de una serie de maneras. Por ejemplo, la preparación de una serie de péptidos cortos que en conjunto extienden la secuencia de la proteína completa se puede utilizar para escrutar la secuencia de la proteína completa. El experto en la técnica puede analizar sistemáticamente en unos pocos polipéptidos grandes la presencia de un epítomo que muestra una reactividad deseada y también analizar progresivamente los fragmentos que se solapan y más pequeños para identificar un epítomo preferible con la especificidad y la reactividad deseadas.

Los polipéptidos y péptidos antigénicos son útiles para producir anticuerpos monoclonales y policlonales. Se pueden generar anticuerpos contra un polipéptido codificado por los polinucleótidos de NSEQ, análogos polipeptídicos o porciones de los mismos mediante los procedimientos que se conocen bien en la técnica. Tales anticuerpos pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y de una sola cadena, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab. Los anticuerpos neutralizantes, tales como los que inhiben la formación de dímeros, se prefieren especialmente para el uso terapéutico. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier técnica que garantice la producción de moléculas de anticuerpo mediante el cultivo continuo de líneas celulares. Estas incluyen, pero sin limitarse a ellas, técnicas de

los hibridomas, el hibridoma de linfocitos B humanos y el EBV-hibridoma. Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos. Alternativamente, se pueden emplear las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena. También se pueden generar Fab que pueden contener sitios de fijación específicos para un polipéptido codificado por los polinucleótidos de NSEQ, o una porción de la misma. Se pueden utilizar varios inmunoensayos para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Se conocen bien en la técnica muchos protocolos para ensayos inmunorradiométricos o de fijación competitiva que utilizan bien anticuerpos monoclonales o policlonales con especificidades establecidas.

Para obtener anticuerpos policlonales, un animal determinado se puede inmunizar con una proteína o con un polipéptido. El suero del animal se puede recoger y tratar de acuerdo con los procedimientos conocidos. Luego, los anticuerpos policlonales contra la proteína o contra el polipéptido de interés se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad. Las técnicas para producir antisueros policlonales se conocen bien en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales (Acm) se pueden generar mediante uno de los muchos procedimientos disponibles para el experto en la técnica, por ejemplo, mediante la fusión de las células productoras del anticuerpo con células inmortalizadas, mediante lo cual se construye un hibridoma. La metodología general para la fusión de los linfocitos B productores de anticuerpo a una línea celular inmortal se encuentra bien dentro del campo de acción de un experto en la técnica. Otro ejemplo es la generación de Acm a partir del mRNA extraído de la médula ósea y de los esplenocitos de animales inmunizados mediante la tecnología de genotecas combinatorias de anticuerpos.

Un inconveniente de los Acm procedentes de animales o de líneas celulares derivadas es que, aunque se pueden administrar a un paciente para propósitos diagnósticos o terapéuticos, a menudo son reconocidos como antígenos extraños por el sistema inmunitario y resultan inapropiados para el uso continuado. Los anticuerpos que no son reconocidos como antígenos extraños por el sistema inmunitario humano tienen un potencial mayor para el diagnóstico y el tratamiento. Los procedimientos para generar anticuerpos humanos y humanizados se conocen bien ahora en la técnica.

Se pueden construir anticuerpos quiméricos en los cuales las regiones de un Acm no humano están reemplazadas por sus homólogos humanos. Un anticuerpo quimérico preferible es uno que tiene secuencias de aminoácidos que comprenden una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR, por su nombre en inglés) de un Acm no humano que se fija a un polipéptido codificado por los polinucleótidos de NSEQ, o una porción de los mismos, injertada en regiones marco (FW, por su nombre en inglés) humanas. Los procedimientos para fabricar tales anticuerpos se conocen bien en la técnica. Los restos de aminoácidos que corresponden a las CDR y las FW los conoce el experto en la técnica.

Se han desarrollado multitud de procedimientos para preservar o mejorar la afinidad por el antígeno que presentan los anticuerpos que comprenden las CDR injertadas. Una manera es incluir en el anticuerpo quimérico los restos del marco foráneo que influyen en la conformación de las regiones CDR. Una segunda manera es injertar las CDR foráneas en los dominios variables humanos con la homología más próxima a la región variable foránea. Así pues, el injerto de una o más CDR humanas en un anticuerpo humano también puede implicar la sustitución de los restos aminoácidos que son adyacentes a una secuencia de CDR particular o que no son contiguos a la secuencia de la CDR, sino que están empaquetados contra la CDR en la estructura global del dominio variable del anticuerpo y que afectan la conformación de la CDR. Por lo tanto, los anticuerpos humanizados incluyen los anticuerpos humanos que comprenden una o más CDR no humanas, así como tales anticuerpos en los que se han realizado otras sustituciones o reemplazos para conservar o mejorar las características fijadoras.

Los anticuerpos quiméricos también incluyen anticuerpos que se han humanizado mediante el reemplazo de los restos expuestos en la superficie que hacen que el Acm parezca humano. Dado que el empaquetamiento interno de los restos aminoácidos en la vecindad del sitio de fijación al antígeno permanece inalterado, se preserva la afinidad. La sustitución de los restos expuestos en la superficie de un polipéptido codificado por los polinucleótidos del anticuerpo contra la NSEQ (o una porción de la misma) de acuerdo con la invención para el propósito de la humanización no significa la sustitución de los restos de la CDR o de los restos adyacentes que influyen en la afinidad por un polipéptido codificado por los nucleótidos de NSEQ, o una porción de la misma.

Los anticuerpos quiméricos también pueden incluir anticuerpos en los que algunos o todos los dominios constantes no humanos han sido reemplazados por el equivalente en los humanos. Esta estrategia tiene la ventaja de que el sitio de fijación al antígeno permanece intacto. Sin embargo, pueden estar presentes cantidades significativas de secuencias no humanas, en donde los dominios variables proceden completamente de anticuerpos no humanos.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen anticuerpos humanos (p. ej., humanizados) que son anticuerpos que consisten esencialmente en secuencias humanas. Los anticuerpos humanos se pueden obtener de genotecas de visualización en fagos, en donde las combinaciones de los dominios variables humanos de las cadenas ligera y pesada se visualizan sobre la superficie de fagos filamentosos. Las combinaciones de los dominios variables se visualizan típicamente en el fago filamentosos en forma de Fab o de scFv. La genoteca se puede escrutar para detectar las combinaciones de dominios variables que tienen las características de fijación al antígeno deseadas que aparecen en los fagos. Las combinaciones de dominios variables preferibles se caracterizan por una elevada afinidad por un polipéptido codificado por los polinucleótidos de NSEQ, o una porción de la misma. Las

combinaciones de dominios variables preferibles también se pueden caracterizar por una elevada especificidad por un polipéptido codificado por los polinucleótidos de NSEQ, o una porción de la misma, y por una escasa reactividad cruzada con otros antígenos relacionados. Al escrutar con repertorios muy grandes de fragmentos de anticuerpos, (2 a 10×10^{10}) se puede aislar una buena diversidad de Acm de elevada afinidad, y se espera que muchos tengan una afinidad de orden subnanomolar por un polipéptido codificado por los polinucleótidos de NSEQ, o una porción de la misma.

Alternativamente, se pueden obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos en los que se han introducido segmentos del gen de Ig humana sin reorganizar y en los que se han inactivado los genes de Ig de ratón endógenos. Los animales transgénicos preferibles contienen fragmentos del gen de Ig contiguos muy grandes que tienen un tamaño superior a 1 Mb, pero los Acm específicos contra el polipéptido humano de moderada afinidad se pueden generar de animales transgénicos que contienen locus génicos más pequeños. Animales transgénicos capaces de expresar sólo los genes de Ig humana se pueden utilizar también para generar antisuero policlonal que comprende anticuerpos sólo de origen animal.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden incluir aquéllos para los cuales se han mejorado la características de fijación mediante la mutación directa o mediante métodos de maduración de la afinidad. La afinidad y la especificidad se pueden modificar o mejorar mediante la mutación de las CDR y mediante el escrutinio de los sitios de fijación al antígeno que tienen las características deseadas. Las CDR se pueden mutar de muchos modos. Una manera es aleatorizar cada resto o combinaciones de restos de tal forma que en una población de sitios fijadores de antígeno por lo demás idénticos, los veinte aminoácidos se pueden encontrar en posiciones concretas. Alternativamente, se pueden inducir mutaciones a lo largo de un margen de restos de CDR mediante métodos de PCR propensos al error. Los vectores de visualización en fagos que contienen el gen de la región variable de las cadenas ligera y pesada se pueden propagar en cepas mutadoras de E. coli. Estos métodos de mutagénesis son ilustrativos de los muchos procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden incluir anticuerpos completos anti-polipéptido, así como fragmentos de anticuerpo y derivados que comprenden un sitio de fijación por un polipéptido codificado por los polinucleótidos de NSEQ, o una porción de los mismos. Los derivados son macromoléculas que comprenden un sitio de fijación unido a un dominio funcional. Los dominios funcionales pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, dominios de señalización, toxinas, enzimas y citocinas.

Los anticuerpos obtenidos por los medios descritos en la presente memoria pueden ser útiles para detectar proteínas, variantes y polipéptidos derivados en los tejidos específicos o en los líquidos corporales. Además, la detección de fragmentos proteicos o proteínas expresados de forma aberrante es una prueba de un estado patológico. Por ejemplo, la expresión de los polipéptidos presentes codificados por los polinucleótidos de la NSEQ, o una porción de la misma, puede indicar que la proteína se están expresando a un ritmo inadecuado o en una etapa del desarrollo inadecuada. Por consiguiente, los presentes anticuerpos pueden ser útiles para detectar enfermedades asociadas a la expresión de la proteína de las NSEQ descritas en la presente memoria.

Se conocen bien en la técnica una serie de protocolos para medir los polipéptidos, entre ellos ELISA, RIA y FACS, y proporcionan una base para diagnosticar los niveles de expresión anómalos o alterados. Los valores estándares para la expresión polipeptídica se establecen mediante la combinación de muestras tomadas de sujetos sanos, preferiblemente humanos, con anticuerpos contra el polipéptido en condiciones para la formación de complejos. La cantidad de complejo formado se puede cuantificar mediante distintos procedimientos, tales como medios fotométricos. La cantidad de polipéptido expresado en las muestras de la enfermedad se puede comparar con los valores estándares. La desviación entre los valores estándares y el problema podría establecer los parámetros para diagnosticar o monitorizar una enfermedad.

El diseño de los inmunoensayos está sujeto a una gran cantidad de variaciones y se conocen muchos de ellos en la técnica. Los inmunoensayos pueden utilizar un reactivo de anticuerpo monoclonal o policlonal que se dirige contra un epítipo del antígeno a ensayar. Alternativamente, puede utilizarse una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales que se dirigen contra más de un epítipo. Los protocolos se pueden basar, por ejemplo, en la competición, donde se pueden utilizar ensayos competitivos de escrutinio de fármacos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de fijarse al polipéptido codificado por los polinucleótidos de NSEQ, o una porción de la misma, compiten específicamente con un compuesto problema por la fijación al polipéptido. Alternativamente se pueden utilizar reacciones directas entre el anticuerpo y el antígeno o ensayos de tipo sándwich, y los protocolos pueden, por ejemplo, servirse de soportes sólidos o de inmunoprecipitación. Además, para facilitar la detección, los anticuerpos pueden estar marcados con una molécula indicadora. También se conocen los ensayos que amplifican la señal de un reactivo fijado. Los ejemplos incluyen inmunoensayos que utilizan avidina y biotina o que utilizan anticuerpos marcados con enzimas o conjugados de antígenos, tal como los ensayos por ELISA.

Los kits adecuados para el inmunodiagnóstico y que contienen los reactivos marcadores apropiados incluyen los anticuerpos dirigidos contra los epítipos o regiones antigénicas de la proteína en polipéptidos, envasados apropiadamente con los reactivos restantes y los materiales necesarios para la realización del ensayo, así como un conjunto adecuado de instrucciones para el ensayo.

También se da a conocer en la presente memoria un kit para ensayar específicamente un polipéptido descrito en la presente memoria, en donde el kit puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse específicamente al polipéptido descrito en la presente memoria.

El kit puede ser un kit de diagnóstico, que puede comprender:

- 5 a) uno o más anticuerpos descritos en la presente memoria; y
- b) un reactivo de detección que puede comprender un grupo indicador.

10 Los anticuerpos pueden estar inmovilizados sobre un soporte sólido. El reactivo de detección puede comprender, por ejemplo, una antiinmunoglobulina, proteína G, proteína A o lectina, etc. El grupo indicador se puede seleccionar, sin limitación, del grupo que consiste en radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, enzimas, biotina y partículas colorantes.

15 También se describe en la presente memoria un procedimiento para identificar un compuesto inhibidor (que inhibe, antagonista) que puede ser capaz de perturbar la función (actividad) o expresión de un polipéptido descrito en la presente memoria, tal como, por ejemplo, los que se pueden seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID n.º 48 a 80 o un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 85 o por la SEQ ID n.º 86, y análogos de las mismas. El procedimiento puede comprender poner en contacto el polipéptido o una célula que expresa el polipéptido con un compuesto candidato y medir la función (actividad) o la expresión del polipéptido. Una reducción en la función o de la actividad del polipéptido (en comparación con la ausencia del compuesto candidato) puede identificar positivamente un compuesto inhibidor idóneo.

20 La falta de función o actividad se puede relacionar con una reducción de la capacidad del polipéptido para favorecer la diferenciación de los osteoclastos, tal como la diferenciación de los osteoclastos inducida por un inductor descrito en la presente memoria o conocido en la técnica.

La célula puede, de forma no natural (endógenamente), expresar (el polipéptido puede no expresarse sustancialmente en una célula) el polipéptido o análogo o, alternativamente, se puede reprimir la expresión de un análogo del polipéptido expresado de forma natural.

25 Por ejemplo, un procedimiento adecuado para escrutar un inhibidor de SEQ ID n.º 1 puede comprender la represión de la expresión del ortólogo de ratón de SEQ ID n.º 25 en una célula de osteoclasto de ratón y evaluar la diferenciación de la célula de osteoclasto que comprende la SEQ IND n.º 1 en presencia o ausencia de un inhibidor candidato y, por ejemplo, un inductor de la diferenciación de los osteoclastos (p. ej., RANKL).

30 También se describe en la presente memoria un procedimiento para identificar un compuesto inhibidor (que inhibe, antagonista) capaz de perturbar la función (actividad) o la expresión de un polipéptido tal como, por ejemplo, SEQ ID n.º 1 o SEQ ID n.º 2. El procedimiento puede comprender, por ejemplo, poner en contacto el polipéptido (aislado) o una célula que expresa el polipéptido con un compuesto candidato y medir la función (actividad) o la expresión del polipéptido. Una reducción en la función o de la actividad del polipéptido (en comparación con la ausencia del compuesto candidato) puede, por lo tanto, identificar un compuesto inhibidor adecuado.

35 De acuerdo con la presente invención, la función o actividad perturbada puede estar asociada, por ejemplo, a una reducción de la capacidad del polipéptido para inhibir o favorecer la diferenciación de los osteoclastos.

La célula utilizada para llevar a cabo el análisis de escrutinio puede expresar de forma no natural (endógenamente) el polipéptido o análogos o, alternativamente, se puede reprimir la expresión de un análogo del polipéptido expresado de forma natural.

40 También se describe en la presente memoria un procedimiento para identificar un regulador positivo o negativo de la diferenciación de los osteoclastos. El procedimiento puede comprender, por ejemplo, realizar un efecto paralizante como el descrito en la presente memoria. El procedimiento puede comprender más en particular a) proporcionar una célula de osteoclasto con un compuesto (p. ej., siRNA) capaz de inhibir específicamente una secuencia diana (p. ej., un polinucleótido o polipéptido como el descrito en la presente memoria), b) inducir la diferenciación (p. ej., con un inductor tal como, por ejemplo, RANKL) y c) determinar el nivel de diferenciación de la célula de osteoclasto (p. ej., medir el número de células diferenciadas, su velocidad de diferenciación, marcador específico de la diferenciación, etc.).

Tras la inhibición de un regulador positivo, el nivel de diferenciación de los osteoclastos aparecerá bajo. Tras la inhibición de un regulador negativo, el nivel de diferenciación de los osteoclastos aparecerá elevado.

50 Otro procedimiento para identificar un regulador positivo o negativo de la diferenciación de los osteoclastos es a) proporcionar una célula con una de las secuencias diana descritas en la presente memoria (polipéptido o polinucleótido capaz de expresar un polipéptido) b) inducir la diferenciación (p. ej., con un inductor tal como, por ejemplo, RANKL) y c) determinar el nivel de diferenciación de las células de osteoclastos (p. ej., medir el número de células diferenciadas, su velocidad de diferenciación, marcador específico de diferenciación, etc.).

Una célula dada a conocer con un regulador positivo de la diferenciación de los osteoclastos puede incrementar su nivel de diferenciación. Una célula proporcionada con un regulador negativo de la diferenciación de los osteoclastos puede disminuir su nivel de diferenciación.

5 También se describe en la presente memoria un procedimiento para identificar un compuesto capaz de interferir con la diferenciación de los osteoclastos, en donde el procedimiento puede comprender poner en contacto una célula que incluye una secuencia polinucleotídica no endógena que comprende una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, 85 u 86 (una porción codificante) y cuantificar (p. ej., el número de) osteoclastos diferenciados. Una reducción de la diferenciación de los osteoclastos en presencia del compuesto en comparación con la ausencia del compuesto puede ser indicativa de un antagonista de la diferenciación de los osteoclastos, mientras que un incremento de la diferenciación de los osteoclastos en presencia del compuesto en comparación con la ausencia del compuesto puede ser indicativa de un agonista de la diferenciación de los osteoclastos.

La célula puede también comprender una forma endógena de un polinucleótido.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «endógena» significa una sustancia que se origina de forma natural dentro de un organismo, tejido o célula. La terminología «polinucleótido endógeno» se refiere a una forma cromosómica de un polinucleótido o versión de RNA (hnRNA, mRNA) producida por una forma cromosómica del polinucleótido. La terminología «polipéptido endógeno» se refiere a la forma de la proteína codificada por un «polinucleótido endógeno».

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «no endógeno» o «exógeno» se utiliza en oposición a «endógeno» en que la sustancia se proporciona de una fuente externa, aunque se puede introducir dentro de la célula. La terminología «polinucleótido no endógeno» se refiere a un polinucleótido sintético introducido dentro de la célula e incluye, por ejemplo y sin limitación, un vector que comprende una secuencia de interés, un mRNA sintético, un oligonucleótido que comprende una NSEQ, etc. La terminología «polipéptido no endógeno» se refiere a la forma de la proteína codificada por un «polinucleótido no endógeno».

25 También se describe en la presente memoria un procedimiento para identificar un compuesto capaz de interferir con la diferenciación de los osteoclastos, en donde el procedimiento puede comprender poner en contacto una célula que incluye en su interior una secuencia polipeptídica no endógena que comprende una cualquiera de SEQ ID n.º 48 a 80, y cuantificar (p. ej., el número de) osteoclastos diferenciados. Una reducción de la diferenciación de los osteoclastos en presencia del compuesto en comparación con la ausencia del compuesto puede ser indicativa de un antagonista de la diferenciación de los osteoclastos, mientras que un incremento de la diferenciación de los osteoclastos en presencia del compuesto en comparación con la ausencia del compuesto puede ser indicativa de un agonista de la diferenciación de los osteoclastos.

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «identidad de secuencia» se refiere a nucleótidos (consecutivos) de una secuencia nucleotídica con referencia a una secuencia nucleotídica original. La identidad se puede comparar a lo largo de una región o sobre la secuencia total de una secuencia de ácido nucleico.

35 Así pues, la «identidad» se puede comparar, por ejemplo, a lo largo de una región de 3, 4, 5, 10, 19, 20 nucleótidos o más (y cualquier número entre ellos). Se tiene que entender en la presente memoria que entre ácidos nucleicos idénticos se pueden encontrar huecos de nucleótidos no idénticos. Por ejemplo, un polinucleótido puede tener una identidad del 100% con otro polinucleótido sobre una porción del mismo. Sin embargo, cuando se compara toda la secuencia de ambos polinucleótidos, los dos polinucleótidos pueden tener un 50% de su secuencia global (total) idéntica entre sí.

40 Quedan abarcados por el presente documento los polinucleótidos descritos en la presente memoria o la porción de los mismos que tienen una identidad de secuencia de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 60 a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, 45 aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 100 %, con un polinucleótido original. Los expertos en la técnica saben que un polinucleótido que tiene una identidad de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100% puede funcionar (p. ej., hibridarse a una secuencia sustancialmente complementaria) de una manera similar a un polinucleótido original y, por lo tanto, puede utilizarse en lugar de un polinucleótido original. Por ejemplo un polinucleótido (una secuencia de ácido nucleico) puede comprender o tener de aproximadamente el 50 al 100 % de 50 identidad con un polinucleótido original sobre una región definida y todavía puede funcionar con la misma eficacia o suficiencia.

El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, con un algoritmo GAP, BESTFIT o FASTA de la versión 7.0 del Wisconsin Genetics Software Package, con el uso de las ponderaciones de los huecos por defecto.

55 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «complementariedad de secuencia» se refiere a los nucleótidos (consecutivos) de una secuencia nucleotídica que son complementarios a una secuencia nucleotídica de referencia (original). La complementariedad se puede comparar sobre una región o sobre toda la secuencia de una secuencia de ácido nucleico.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria o una porción de los mismos que tienen una complementariedad de secuencia de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 60 a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 100 % con un polinucleótido original están, por lo tanto, englobados por este documento. Los expertos en la técnica saben que un polinucleótido que tiene una complementariedad de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 % con una secuencia original puede alinearse lo suficiente a esa secuencia para llevar a cabo la presente invención (p. ej., inhibir la expresión del polinucleótido original).

Se debe entender en la presente memoria que un «análogo» es una molécula que tiene una actividad biológica y una estructura química similares a la de un polipéptido descrito en la presente memoria. Un «análogo» puede tener una similitud de secuencia con la de una secuencia original o una porción de una secuencia original y también puede tener una modificación de su estructura como las explicadas en la presente memoria. Por ejemplo, un «análogo» puede tener una similitud de secuencia de al menos el 90 % con una secuencia original o una porción de una secuencia original. Un «análogo» también puede tener, por ejemplo; al menos el 70 % o incluso el 50 % de similitud de secuencia (o menos, a saber, al menos el 40 %) con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

De igual forma, un «análogo» referido a un polipéptido puede tener, por ejemplo, al menos el 50 % de similitud de secuencia con una secuencia original con una combinación de una o varias modificaciones en un esqueleto o cadena lateral de un aminoácido, o una adición de un grupo u otra molécula, etc.

«Polinucleótido» se refiere de forma general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA sin modificar, o RNA o DNA modificado. «Polinucleótidos» incluye, sin limitación, DNA monocatenario y bicatenario, DNA que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, RNA monocatenario y bicatenario y RNA que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, «polinucleótido» se refiere a regiones tricatenarias que comprenden RNA o DNA o tanto RNA como DNA. La terminología polinucleótido también incluye DNA o RNA que contienen una o más bases modificadas y DNA o RNA con esqueletos modificados que les dan estabilidad o por otras razones. Las bases «modificadas» incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se pueden efectuar numerosas modificaciones al DNA y al RNA; así pues, «polinucleótido» abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de polinucleótidos como se encuentran de forma típica en la naturaleza, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células. «Polinucleótido» incluye, pero sin limitarse a ellas, moléculas lineales y cerradas por los extremos. «Polinucleótido» también engloba polinucleótidos relativamente cortos, a menudo denominados oligonucleótidos.

«Polipéptidos» se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados (a saber, isoésteres peptídicos). «Polipéptido» se refiere tanto a cadenas cortas, que se suelen denominar péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas que se suelen denominar proteínas. Tal y como se describe más arriba, los polipéptidos pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos proteínogénicos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «análogo polipeptídico» se refiere a mutantes, variantes, quimeras, fusiones, deleciones, adiciones y cualquier otro tipo de modificación hecha respecto a un polipéptido dado.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «biológicamente activo» se refiere a una variante o fragmento que conserva alguna o toda la actividad biológica del polipéptido natural, a saber, que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos. Los polipéptidos o fragmentos de la presente invención también pueden incluir polipéptidos o fragmentos «inmunológicamente activos». Los «polipéptidos o fragmentos inmunológicamente activos» pueden ser útiles para los propósitos de inmunización (p. ej, para generar anticuerpos).

Así pues, los polipéptidos biológicamente activos en forma de los polipéptidos originales, fragmentos (modificados o no), análogos (modificados o no), derivados (modificados o no), homólogos (modificados o no) de los polipéptidos descritos en la presente memoria están englobados por la presente invención.

Por consiguiente, estará englobado por la presente memoria cualquier polipéptido que tenga una modificación en comparación con un polipéptido original que no destruya significativamente una actividad biológica deseada. Se sabe bien en la técnica que se pueden efectuar una serie de modificaciones a los polipéptidos de la presente invención sin afectar perjudicialmente su actividad biológica. Estas modificaciones pueden, por otra parte, mantener o incrementar la actividad biológica del polipéptido original, o pueden optimizar una o más de la particularidades (p, ej, estabilidad, biodisponibilidad, etc.) de los polipéptidos de la presente invención que, en algún caso, podría ser deseable. Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, los que contienen secuencias de aminoácidos modificadas bien mediante procesos naturales, tal como el procesamiento postraduccion, o bien mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Las modificaciones se pueden

producir en cualquier posición de un polipéptido, que incluyen el esqueleto del polipéptido, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino y carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en la misma o diferente magnitud en varios sitios del polipéptido dado. De igual forma, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Se debe entender en la presente memoria que una modificación de los polipéptidos descritos en la presente memoria estará englobada por la presente invención siempre que la actividad biológica sea similar a la del polipéptido original (madre).

Tal y como se explicó más arriba, la modificación del polipéptido puede comprender, por ejemplo, la inserción (por ejemplo, adición), delección y sustitución (a saber, reemplazo) de aminoácidos, bien conservativa o no conservativa (p. ej., aminoácidos D, desaminoácidos) en la secuencia polipeptídica, en donde tales cambios no alteran sustancialmente la actividad biológica global del polipéptido.

Ejemplos de sustituciones pueden ser las que son conservativas (a saber, cuando un resto se reemplaza por otro del mismo tipo general o grupo) o, cuando se desee, no conservativas (a saber, cuando un resto se reemplaza por un aminoácido de otro tipo). Además, un aminoácido que no se produce de forma natural puede sustituir a un aminoácido que se produce de forma natural (a saber, sustitución conservativa de aminoácido que no se produce en la naturaleza o una sustitución no conservativa de aminoácido que no se produce en la naturaleza).

Como se sabe, los aminoácidos que se producen de forma natural se pueden subclasificar en ácidos, básicos, neutros y polares, o neutros y apolares. Además, tres de los aminoácidos codificados son aromáticos. Puede resultar útil que los polipéptidos codificados que difieren del polipéptido determinado de la presente invención contengan sustituciones de codones para los aminoácidos, que son del mismo tipo o grupo que el aminoácido a reemplazar. Así pues, en algunos casos, los aminoácidos básicos Lys, Arg e His pueden ser intercambiables; los aminoácidos ácidos Asp y Glu puede ser intercambiables; los aminoácidos polares neutros Ser, Thr, Cys, Gln y Asn pueden ser intercambiables; los aminoácidos alifáticos apolares Gly, Ala, Val, Ile y Leu son intercambiables, pero debido a su tamaño, Gly y Ala tienen una relación más cercana, y Val, Ile y Leu tienen otra relación cercana entre sí, y los aminoácidos aromáticos Phe, Trp y Tyr pueden ser intercambiables.

Se debe notar además que si los polipéptidos se construyen sintéticamente, también se pueden realizar sustituciones con los aminoácidos que no están codificados de forma natural en el DNA (aminoácido que no se produce de forma natural o aminoácido no natural).

Un aminoácido que no se produce de forma natural se debe entender en la presente memoria que es un aminoácido que no se produce de forma natural o que no se encuentra en un mamífero. Un aminoácido que no se produce de forma natural comprende un aminoácido D, un aminoácido que tiene un grupo acetilaminometil conectado a un átomo de azufre de una cisteína, un aminoácido pegilado, etc. La inclusión de un aminoácido que no se produce de forma natural en una secuencia polipeptídica definida, por lo tanto, generará un derivado del polipéptido original. Los aminoácidos (restos) que no se producen de forma natural incluyen también los aminoácidos ω de la fórmula $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, en la que n es 2-6, aminoácidos apolares neutros, tales como sarcosina, t-butilalanina, t-butilglicina, N-metilisoleucina, norleucina, etc. La fenilglicina puede sustituir a Trp, Tyr o Phe; la citrulina y el sulfóxido de metionina son apolares neutros, el ácido cisteico es ácido y la ornitina es básica. La prolina se puede sustituir por hidroxiprolina y conservar las propiedades que confiere la conformación.

Se sabe en la técnica que se pueden generar análogos mediante mutagénesis sustitutiva y que conserven la misma actividad biológica de los polipéptidos de la presente invención. Estos análogos tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de la proteína retirada y un resto diferente insertado en su lugar. Por ejemplo, un sitio de interés para la mutagénesis sustitutiva puede incluir, pero sin limitarse a ellos, sitios identificados como los centro(s) activo(s), o sitio(s) inmunitario(s). Otros sitios de interés pueden ser aquéllos, por ejemplo, en los que determinados restos obtenidos de diferentes especies son idénticos. Estas posiciones pueden ser importantes para la actividad biológica. En la tabla A se muestran los ejemplos de sustituciones identificadas como «sustituciones conservativas». Si tales sustituciones dan lugar a un cambio no deseado, entonces se introducen otro tipo de sustituciones, denominadas «sustituciones ejemplares» en la tabla A, o como se describe adicionalmente en la presente memoria en referencia a las clases de aminoácidos, y se escrutan los productos.

En algunos casos puede resultar interesante modificar la actividad biológica de un polipéptido mediante la sustitución, inserción o delección de aminoácidos. Por ejemplo, la modificación de un polipéptido puede dar lugar a un incremento de la actividad biológica del polipéptido, puede modular su toxicidad, puede dar lugar a cambios de la biodisponibilidad o de la estabilidad, o puede modular su actividad inmunitaria o identidad inmunitaria. Las modificaciones sustanciales de la función o de la identidad inmunitaria se llevan a cabo mediante la selección de sustituciones cuyo efecto difiere significativamente a la hora de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o en hélice, (b) la carga o la hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena literal. Los restos que aparecen de forma natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, metionina (Met), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile)
- (2) hidrófilos neutros: cisteína (Cys), serina (Ser), treonina (Thr)

- (3) ácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu)
- (4) básicos: asparragina (Asn), glutamina (Gln), histidina (His), lisina (Lys), arginina (Arg)
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: glicina (Gly), prolina (Pro); y aromáticos: triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe).

5 Las sustituciones no conservativas conllevarán el intercambio de un miembro de una estas clases por otro.

TABLA A. Sustitución ejemplar de los aminoácidos

Resto original	Sustitución ejemplar	Sustitución conservativa
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

10 Se tiene que entender en la presente memoria que si se mencionan un «intervalo» o «grupo» de sustancias (p. ej, aminoácidos), «sustituyentes» o similares, o si se mencionan otros tipos de una característica determinada (p. ej, temperatura, presión, estructura química, tiempo, etc.), la presente invención se refiere a todos y cada uno de los miembros específicos, y a cualquier combinación de subintervalos o subgrupos de ellos, y explícitamente los incorpora en la presente memoria. Así pues, cualquier intervalo o grupo especificado se debe entender como un

modo abreviado de referirse a todos y cada uno de los miembros de un intervalo o grupo individualmente, así como a todos y cada uno de los posibles subintervalos o subgrupos englobados en éstos; y de igual forma con respecto a cualquier subintervalo o subgrupos en éstos. Así pues, por ejemplo, respecto a un porcentaje (%) de identidad de aproximadamente el 80 al 100 %, se debe entender que en la presente memoria se incorpora específicamente el % de todos y cada uno de los individuos, así como el subintervalo, tal como por ejemplo 80 %, 81 %, 84,78 %, 93 %, 99 %, etc.; y de igual forma con respecto a otros parámetros tales como concentraciones, elementos, etc.

Se describe en la presente memoria un polinucleótido aislado para el uso en el tratamiento y/o diagnóstico de una osteopatía y/o para el uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos, en donde el polinucleótido se expresa diferencialmente en las células de osteoclasto diferenciadas en comparación con las células precursoras de osteoclasto sin diferenciar. El polinucleótido aislado puede comprender un miembro seleccionado entre a) un polinucleótido que comprende una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86; b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86; c) un polinucleótido que comprende una porción que se puede transcribir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86; d) un polinucleótido que comprende una porción que se puede traducir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86; e) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente idéntica a una cualquiera de a) a d), f) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una cualquiera de a) a e), y/o g) un fragmento de una cualquiera de a) a f).

También se describe en la presente memoria una secuencia polipeptídica aislada para el uso en el tratamiento y/o el diagnóstico de una osteopatía y/o para el uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos, en donde el polipéptido se expresa diferencialmente en la célula de osteoclasto diferenciada en comparación con la célula precursora de osteoclasto sin diferenciar. El polipéptido aislado puede comprender una secuencia seleccionada entre a) una cualquiera de SEQ ID n.º 48 a 80, b) un polipéptido codificado por una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 u 86, c) un fragmento biológicamente activo de una cualquiera de a) o b), y/o d) un análogo biológicamente activo de una cualquiera de a) o b).

También se describe en la presente memoria un anticuerpo aislado y/o purificado, en donde dicho anticuerpo puede ser capaz de fijarse específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica codificada por una cualquiera de SEQ ID n.º 85 u 86 y/o un fragmento de al menos 6 aminoácidos de dicho polipéptido. También queda abarcado por la presente invención una célula de hibridoma que puede producir un anticuerpo capaz de fijarse específicamente a un polipéptido codificado por SEQ ID n.º 85 u 86 y/o un fragmento de al menos 6 aminoácidos de dicho polipéptido. También está englobado por la presente memoria el uso de un polipéptido aislado que puede comprender una secuencia seleccionada entre a) una cualquiera de SEQ ID n.º 48 a 80, b) un polipéptido codificado por una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 u 86, c) un fragmento biológicamente activo de una cualquiera de a) o b), y/o d) un análogo biológicamente activo de una cualquiera de a) o b) para detectar un anticuerpo que se fija específicamente al polipéptido.

También se describe en la presente memoria un inmunoensayo para la detección de anticuerpos que se fijan específicamente a al menos una secuencia polipeptídica aislada que se expresa diferencialmente en las células de osteoclasto diferenciadas en comparación con las células precursoras de osteoclasto sin diferenciar que puede comprender una secuencia seleccionada entre a) una cualquiera de SEQ ID n.º 48 a 80, b) un polipéptido codificado por una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 u 86, c) un fragmento biológicamente activo de una cualquiera de a) o b), y/o d) un análogo biológicamente activo de una cualquiera de a) o b) y/o un análogo biológicamente activo que puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en tal secuencia. El inmunoensayo puede comprender las etapas de: a) poner en contacto una muestra de una muestra de líquido biológico de un mamífero con el polipéptido y/o b) detectar la formación del complejo inmunitario entre el polipéptido y los anticuerpos en dicha muestra.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para prevenir una osteopatía en un mamífero que lo necesita. El procedimiento puede comprender la administración a dicho mamífero de un polinucleótido aislado descrito en la presente memoria y/o una composición farmacéutica que puede comprender un polinucleótido descrito en la presente memoria.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para tratar una osteopatía en un individuo que lo necesita. El procedimiento puede comprender la administración de un compuesto capaz de interferir con la actividad y/o la expresión de un polipéptido descrito en la presente memoria, por ejemplo, cualquier polipéptido que consiste en SEQ ID n.º 48 a 80 y/o un polipéptido codificado por una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 y/u 86.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo aislado y/o purificado. Un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser capaz de fijarse específicamente a un polipéptido codificado por una cualquiera de SEQ ID n.º 85, 86 y/o un fragmento de al menos 6 aminoácidos de dichos polipéptidos. También se encuentra abarcada por la presente memoria una composición que puede comprender tal anticuerpo. También se describe en la presente memoria un procedimiento para fabricar un anticuerpo. Tal procedimiento puede comprender inmunizar un animal no humano con un fragmento inmunógeno de un polipéptido codificado por, por ejemplo, la SEQ ID n.º 85 u 86 y/o un fragmento de al menos 6 aminoácidos de dicho polipéptido. También se encuentra descrita en la presente memoria una genoteca de secuencias polinucleotídicas que se pueden expresar diferencialmente en una

célula de osteoclasto diferenciada en comparación con una célula precursora de osteoclasto sin diferenciar. La genoteca puede comprender una cualquiera de SEQ ID n.º 85 y/o SEQ ID n.º 86 y/o al menos un miembro seleccionado entre a) un polinucleótido que comprende una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, c) un polinucleótido que comprende una porción que se puede transcribir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, d) un polinucleótido que comprende una porción que se puede traducir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, e) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente idéntica a una cualquiera de a) a d); f) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una cualquiera de a) a e), y/o g) un fragmento de una cualquiera de a) a f).

10 También se describe en la presente memoria un procedimiento para modular la diferenciación de los osteoclastos en un individuo que lo necesita. El procedimiento puede comprender administrar un compuesto capaz de interferir con la actividad y/o la expresión de un polipéptido tal como la SEQ ID n.º 48 a 80 y/o un polipéptido codificado por una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a 33, SEQ ID n.º 85 u 86.

15 También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica para modular la diferenciación de los osteoclastos. La composición farmacéutica puede comprender un polinucleótido aislado tal como a) un polinucleótido que comprende una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86, b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86, c) un polinucleótido que comprende una porción que se puede transcribir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86, d) un polinucleótido que comprende una porción traducible de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86, e) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente idéntica a una cualquiera de a) a d), f) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una cualquiera de a) a e), y/o g) un fragmento de una cualquiera de a) a f), y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 También se describe en la presente memoria una molécula de siRNA y/o shRNA que puede disminuir la expresión de un polinucleótido tal como a) un polinucleótido que comprende una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86, b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86, c) un polinucleótido que comprende una porción que se puede transcribir de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86, d) un polinucleótido que comprende una porción traducible de una cualquiera de SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 33, 85 u 86, e) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente idéntica a una cualquiera de a) a d), f) un polinucleótido que comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una cualquiera de a) a e), y/o g) un fragmento de una cualquiera de a) a f).

25 En particular se debe entender en la presente memoria que los procedimientos de la presente invención incluyen todas y cada una de las etapas individuales descritas por éstos, así como las definidas como que incluyen decididamente determinadas etapas o que excluyen determinadas etapas o una combinación de ambas; por ejemplo, una definición de exclusión para un procedimiento de la presente invención puede leerse como sigue: «siempre y cuando dicho polipéptido no comprenda o no consista en la SEQ ID n.º 34 o el marco abierto de lectura de SEQ ID n.º 34» o «siempre y cuando dicho polipéptido no comprenda o no consista en la SEQ ID n.º 82» o «siempre y cuando dicho fragmento polinucleotídico o dicho fragmento polipeptídico tenga una longitud de menos de X unidades (p. ej., nucleótidos o aminoácidos) o de más de X unidades (p. ej., nucleótidos o aminoácidos)».

35 Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que viene a continuación. Sin embargo, se debe entender que la descripción y los ejemplos específicos que vienen a continuación, aunque indican realizaciones preferibles de la invención, se ofrecen sólo con fines ilustrativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En los dibujos adjuntos:

45 Para cada una de las figuras 1 a 34 y 38 a 39 se prepararon macromatrices mediante la amplificación de RNA con RAMP de células precursoras humanas (A-F 1) y de osteoclastos diferenciados intermedios (A-F 2-3) y maduros de cuatro donantes humanos (A-F 4) y 30 tejidos humanos normales diferentes [glándula suprarrenal (A5), hígado (B5), pulmón (C5), ovario (D5), músculo esquelético (E5), corazón (F5), cuello de útero (G5), tiroides (H5), mama (A6), placenta (B6), corteza suprarrenal (C6), riñón (D6), vena cava (E6), trompa de Falopio (F6), páncreas (G6), testículo (H6), yeyuno (A7), aorta (B7), esófago (C7), próstata (D7), estómago (E7), bazo (F7), íleon (G7), tráquea (A8), cerebro (B8), colon (C8), timo (D8), intestino delgado (E8), vejiga (F8) y duodeno (G8)]. El clon de DNA bicatenario de STAR que representa las correspondientes SEQ ID n.º se marcó con ³²P y se hibridó con la macromatriz. La reacción de marcación de la sonda se enriqueció también con una secuencia de DNA bicatenario de Arabidopsis, que se hibrida a su propia secuencia (M) depositada en la macromatriz para que sirva de control para la reacción de marcación. La cuantificación de la señal de hibridación en cada punto se realizó con un Phosphorimager STORM 820 y el programa informático ImageQuant TL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Como nivel basal se utilizó un valor de log₂ que representa el promedio de las señales para los precursores (A-F 1) y se sustrajo del valor de log₂ obtenido para cada una de las muestras restantes con el objeto de determinar su abundancia relativa en comparación con los precursores, y se representó en un gráfico de barras (panel derecho).

- 5 La figura 30 es un dibujo de los resultados de hibridación de macromatrices y de la cuantificación de la intensidad de las señales que muestra los datos de expresión diferencial para la SEQ ID n.º 30 humana específica de los osteoclastos del STAR correspondiente. Los resultados de hibridación obtenidos confirman su inducción en todas las muestras de osteoclastos humanos al ser la expresión generalmente más alta en los osteoclastos más maduros (A-F 2-4) que en los precursores (A-F 1) y haber poca o ninguna expresión en todos o la mayor parte de los tejidos normales (A-H 5-6 y A-G 7-8);
- 10 La figura 31 es un dibujo de los resultados de hibridación de macromatrices y de la cuantificación de la intensidad de las señales que muestra los datos de expresión diferencial para la SEQ ID n.º 31 humana específica de los osteoclastos del STAR correspondiente. Los resultados de hibridación obtenidos confirman su inducción en todas las muestras de osteoclastos humanos al ser la expresión generalmente más alta en los osteoclastos más maduros (A-F 2-4) que en los precursores (A-F 1) y haber poca o ninguna expresión en todos o la mayor parte de los tejidos normales (A-H 5-6 y A-G 7-8);
- 15 La figura 32 es un dibujo de los resultados de hibridación de macromatrices y de la cuantificación de la intensidad de las señales que muestra los datos de expresión diferencial para la SEQ ID n.º 32 humana específica de los osteoclastos del STAR correspondiente. Los resultados de hibridación obtenidos confirman su inducción en todas las muestras de osteoclastos humanos al ser la expresión generalmente más alta en los osteoclastos más maduros (A-F 2-4) que en los precursores (A-F 1) y haber poca o ninguna expresión en todos o la mayor parte de los tejidos normales (A-H 5-6 y A-G 7-8);
- 20 La figura 33 es un dibujo de los resultados de hibridación de macromatrices y de la cuantificación de la intensidad de las señales que muestra los datos de expresión diferencial para la SEQ ID n.º 33 humana específica de los osteoclastos del STAR correspondiente. Los resultados de hibridación obtenidos confirman su inducción en todas las muestras de osteoclastos humanos al ser la expresión generalmente más alta en los osteoclastos más maduros (A-F 2-4) que en los precursores (A-F 1) y haber poca o ninguna expresión en todos o la mayor parte de los tejidos normales (A-H 5-6 y A-G 7-8);
- 25 La figura 34 es un dibujo de los resultados de hibridación de macromatrices y de la cuantificación de la intensidad de las señales que muestra los datos de expresión diferencial para la SEQ ID n.º 34 humana específica de los osteoclastos del STAR correspondiente. Los resultados de hibridación obtenidos confirman su inducción en todas las muestras de osteoclastos humanos al ser la expresión generalmente más alta en los osteoclastos más maduros (A-F 2-4) que en los precursores (A-F 1) y haber poca o ninguna expresión en todos o la mayor parte de los tejidos normales (A-H 5-6 y A-G 7-8);
- 30 La figura 35 es un dibujo que muestra los efectos bloqueadores de la osteoclastogénesis debidos a la atenuación de la expresión endógena de la SEQ ID n.º 1 (AB0326) y de la SEQ ID n.º 2 (AB0369) mediante el uso de shRNA. Se observó una disminución significativa del número de osteoclastos plurinucleados a partir de células precursoras infectadas con el shRNA de AB0326 (figura 35A; panel inferior) el y shRNA de AB0369 (figura 1B, panel inferior) en comparación con los del shRNA de lacZ (figura 35A y B; paneles superiores). Estos resultados indicaron claramente que la expresión del gen que codifica la SEQ ID n.º 1 (AB0326) y la SEQ ID n.º 2 (AB0369) son necesarios para la diferenciación de los osteoclastos;
- 35 La figura 36 es un dibujo que muestra los efectos bloqueadores de la osteoclastogénesis debidos al ortólogo de ratón para AB0326 (SEQ ID n.º 35) en el modelo RAW 264.7 mediante el uso del shRNA-0326.2 (SEQ ID n.º 45). La línea celular RAW-0326.2 produjo de forma significativa menos osteoclastos (figura 36, panel inferior) que la línea celular que contiene el shRNA aleatorizado (figura 36, panel superior). Este resultado, junto con el obtenido en las células precursoras de los osteoclastos humanos utilizando el sistema lentivírico de administración de shRNA demuestran que en los humanos y en los ratones se necesita claramente el producto génico AB0326 para la osteoclastogénesis;
- 40 La figura 37 es un dibujo que muestra los resultados de un ensayo de complementación funcional para la SEQ ID n.º 1 (AB0326) en las células RAW-0326.2 para escrutar inhibidores de la osteoclastogénesis. Las células RAW-0326.2 transfectadas con el vector pd2 vacío son incapaces de formar osteoclastos en presencia del ligando de RANK (panel central), lo que indica que el shRNA de AB0326 de ratón sigue siendo capaz de silenciar la expresión del gen de AB0326 en estas células. A la inversa, con el cDNA del AB0326 humano (pd2-hAB0326) se rescatan las células transfectadas y, por lo tanto, se diferencian con más eficacia en osteoclastos en respuesta al ligando de RANK (panel derecho). Las células RAW 264.7 de tipo silvestre que contienen el vector vacío (pd2) no tienen alterada la formación de osteoclastos en presencia del ligando de RANK (panel izquierdo), lo que descarta cualquier efecto debido a pd2. Por lo tanto, este ensayo de complementación se puede utilizar para escrutar los inhibidores del polipéptido de AB0326 humano;
- 45 La figura 38 es un dibujo de los resultados de hibridación de macromatrices y de la cuantificación de la intensidad de las señales que muestran los datos de expresión diferencial para la SEQ ID n.º 85 humana específica de los osteoclastos del STAR correspondiente. Se prepararon las macromatrices mediante amplificación del RNA con RAMP a partir de las células precursoras humanas (A-F 1) y los osteoclastos diferenciados intermedios y maduros de cuatro donantes humanos (A-F 2-4) y 30 tejidos humanos normales diferentes [glándula suprarrenal, hígado,
- 50
- 55

pulmón, ovario, músculo esquelético, corazón, cuello de útero, tiroides, mama, placenta, corteza suprarrenal, riñón, vena cava, trompa de Falopio, páncreas, testículo, yeyuno, aorta, esófago, próstata, estómago, bazo, íleon, tráquea, cerebro, colon, timo, intestino delgado, vejiga y duodeno (A-H 5-6 y A-G 7-8)]. El clon STAR que representa la SEQ ID n.º 85 se marcó con ³²P y se hibridó a la macromatriz. Los resultados de hibridación obtenidos confirman su inducción en todas las muestras de osteoclastos humanos al ser la expresión generalmente más alta en los osteoclastos más maduros (A-F 2-4) que en los precursores (A1-F1) y haber poca o ninguna expresión en todos o la mayor parte de los tejidos normales (A-H 5-6 y A-G 7-8), y;

La figura 39 es un dibujo de los resultados de hibridación de macromatrices y de la cuantificación de la intensidad de las señales que muestran los datos de expresión diferencial para la SEQ ID n.º 86 humana específica de los osteoclastos del STAR correspondiente. Se prepararon las macromatrices por amplificación del RNA con RAMP a partir de células precursoras humanas (A-F 1) y osteoclastos diferenciados intermedios y maduros de cuatro donantes humanos (A-F 2-4) y 30 tejidos humanos normales diferentes [glándula suprarrenal, hígado, pulmón, ovario, músculo esquelético, corazón, cuello de útero, tiroides, mama, placenta, corteza suprarrenal, riñón, vena cava, trompa de Falopio, páncreas, testículo, yeyuno, aorta, esófago, próstata, estómago, bazo, íleon, tráquea, cerebro, colon, timo, intestino delgado, vejiga y duodeno (A-H 5-6 y A-G 7-8)]. El clon STAR que representa la SEQ ID n.º 86 se marcó con ³²P y se hibridó a la macromatriz. Los resultados de hibridación obtenidos confirman su inducción en todas las muestras de osteoclastos humanos al ser la expresión generalmente más alta en los osteoclastos más maduros (A-F 2-4) que en los precursores (A1-F1) y haber poca o ninguna expresión en todos o la mayor parte de los tejidos normales (A-H 5-6 y A-G 7-8).

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

El solicitante empleó una estrategia cuidadosamente planificada para identificar y aislar secuencias genéticas implicadas en la osteoclastogénesis y la remodelación ósea. El proceso implicó las etapas siguientes: 1) preparación de genotecas de cDNA muy representativas a partir del mRNA aislado de precursores y osteoclastos diferenciados intermedios y maduros de origen humano; 2) aislamiento de las secuencias inducidas durante la osteoclastogénesis; 3) identificación y caracterización de secuencias inducidas; 4) selección de secuencias inducidas para la especificidad del tejido; y 5) determinación de los efectos bloquedores de la osteoclastogénesis. Los resultados explicados en esta descripción muestran la ventaja de actuar selectivamente sobre genes de osteoclastos que son específicos de este tipo de células diferenciadas y proporcionar un procedimiento de escrutinio más eficaz para estudiar la base genética de enfermedades y trastornos. Los genes que se sabe que intervienen en otras áreas de la biología se ha demostrado que desempeñan una función crítica en la osteoclastogénesis y en el funcionamiento de los osteoclastos. Los genes que se conocen, pero a los que no se les había asignado una función hasta la presente descripción, también se han aislado y presentan una función crítica en la osteoclastogénesis y en el funcionamiento de los osteoclastos. Finalmente, se han identificado nuevos genes que intervienen en el proceso; sin embargo, el solicitante reserva su descripción hasta que se hayan completado más estudios.

La presente invención se ilustra con más detalle a continuación de una manera no limitante.

A.- Material y métodos

Se utilizaron reactivos disponibles en el mercado que se citan en la presente invención de acuerdo con las instrucciones del proveedor, a menos que se indique de otra manera. A lo largo de la presente descripción se prepararon determinados materiales de partida del siguiente modo:

B.- Preparación de las células diferenciadas en osteoclastos

La línea celular RAW 264.7 (RAW) precursora de osteoclastos y las células precursoras humanas (linfocitos mononucleados de la sangre periférica o progenitores CD34+) se conocen bien en la técnica como modelos humanos y murinos de la osteoclastogénesis. Estos osteoclastos humanos y murinos son, por consiguiente, excelentes fuentes de material para aislar y caracterizar los genes especializados en el funcionamiento de los osteoclastos.

Los osteoclastos primarios humanos se diferenciaron a partir de linfocitos mononucleados de la sangre periférica movilizados por el G-CSF (Cambrex, East Rutherford, NJ) como describe el proveedor en presencia de M-CSF a 35 ng/ml y de ligando de RANK a 100 ng/ml. Los osteoclastos plurinucleados teñidos con TRAP fueron visibles a los 11-14 días. Los osteoclastos también procedían de las células precursoras de osteoclastos humanos (progenitores CD34+) (Cambrex, East Rutherford, NJ) y se cultivaron como describe el proveedor. En el último caso, los osteoclastos se obtuvieron después de 7 días.

Las células RAW se compraron a la American Type Culture Collection y se mantuvieron en DMEM con glucosa alta que contenía suero bovino fetal al 10% y antibióticos. Las células se subcultivaron bisemanalmente un máximo de 10-12 pases. Para los experimentos de diferenciación de los osteoclastos, las células RAW se sedimentaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 4×10^3 células/pocillo y se dejaron multiplicar durante 24 horas. La diferenciación se indujo en DMEM con glucosa alta, suero bovino fetal tratado con carbón vegetal al 10% (Hyclone, Logan, UT), SAB al 0,05%, antibióticos, factor estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF) a 10 ng/ml y ligando del receptor activador de NF- κ B (RANK) a 100 ng/ml. Las placas se realimentaron el día 3 y los osteoclastos

se vieron con claridad el día 4. Típicamente, a las células se les tiñó la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP, por su nombre en inglés) el día 4 o 5 a menos que se indicase de otra manera. Para la tinción con TRAP, las células se lavaron con PBS y se fijaron en formaldehído al 10% durante 1 hora. Después de dos lavados con PBS, las células se volvieron ligeramente permeables en Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 5 min antes de lavarlas en PBS. La tinción se llevó a cabo a 37 °C durante 20-25 minutos en fosfato de naftol AS-MX al 0,01%, Fast Red Violet al 0,06%, tartrato de sodio a 50 mM, acetato de sodio a 100 mM, pH 5,2. Las células se visualizaron al microscopio.

C.- Procedimiento para aislar el mRNA expresado diferencialmente

Algo clave al descubrimiento de secuencias expresadas diferencialmente que serán únicas para los osteoclastos es el uso de la tecnología STAR patentada por el solicitante (Subtractive Transcription-based Amplification of mRNA; patente de los EE.UU. n.º 5 712 127, Malek et al., registrada el 27 de enero de 1998). En este procedimiento, el mRNA aislado de los osteoclastos intermedios y maduros se utiliza para preparar el «RNA problema» que se hibrida al «DNA sustractor» monocatenario complementario preparado a partir del mRNA de los precursores de osteoclastos y sólo se recupera el «RNA problema» sin hibridar, y se utiliza para crear genotecas de cDNA clonado, denominadas «genotecas sustractivas». Por lo tanto, las «genotecas sustractivas» están enriquecidas en secuencias expresadas diferencialmente que incluyen mRNA nuevos y raros que a menudo no se detectan en el análisis de hibridación de micromatrices. Estos mRNA nuevos y raros se cree que son representativos de importantes dianas génicas para el desarrollo de mejores estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Los clones contenidos en las «genotecas sustractivas» se identifican mediante el análisis de la secuencia del DNA y su posible función se evalúa mediante la adquisición de la información disponible en las bases de datos públicas (NCBI y GeneCard). Los clones no redundantes luego se utilizan para preparar micromatrices de DNA, que se utilizan para cuantificar sus patrones de expresión diferencial relativa mediante la hibridación en sondas de cDNA fluorescente. Se pueden utilizar dos clases de sondas de cDNA, las que se generan de transcritos de RNA preparados de las mismas genotecas sustractivas (sondas sustractivas), o bien de mRNA aislado de diferentes muestras de osteoclastos (sondas estándares). El uso de las sondas sustractivas proporciona mayor sensibilidad para detectar las secuencias de mRNA poco abundantes que se preservan y enriquecen mediante STAR. Además, la especificidad de las secuencias expresadas diferencialmente en los osteoclastos se mide mediante la hibridación de sondas radiomarcadas preparadas de cada secuencia seleccionada en macromatrices que contienen RNA de diferentes muestras de osteoclastos y diferentes tejidos humanos normales. Adicionalmente, el análisis de transferencia Northern se realiza para confirmar la presencia de una o más especies de mRNA específico en las muestras de osteoclastos. Después de esto, los cDNA de longitud completa representativos de las especies de mRNA y/o variantes de ajuste se clonan en E. coli DH10B.

Un desafío importante en el perfil de expresión génica es la poca cantidad de RNA disponible para el análisis molecular. La cantidad de RNA aislado de muchas muestras de osteoclastos o especímenes humanos (aspiración con aguja, muestras de microdissección para captura con láser (LCM, por su nombre en inglés) y cultivos de células transfectadas) a menudo es insuficiente para preparar: 1) materiales sustractor y problema convencionales para STAR; 2) sondas de cDNA estándares para el análisis de micromatrices de DNA; 3) macromatrices del RNA para evaluar la especificidad de la expresión, 4) análisis de transferencia Northern y 5) clones de cDNA completos para la posterior validación y caracterización biológicas, etc. Así pues, el solicitante ha desarrollado una tecnología propietaria llamada RAMP (Procedimiento de amplificación del RNA) (solicitud de patente de los EE.UU. n.º 11/000 958 publicada con el n.º de patente de los EE.UU. US 2005/0153333A1 el 14 de julio de 2005 y titulada «Selective Terminal Tagging of Nucleic Acids»), que amplifica de forma lineal el mRNA contenido de las muestras de RNA total y produce cantidades del orden de microgramos de RNA amplificado, suficiente para las diferentes aplicaciones analíticas. El RNA producido por RAMP son secuencias de tipo mRNA de longitud completa como resultado del procedimiento propietario para añadir una etiqueta de secuencia terminal a los extremos 3' de las moléculas de cDNA monocatenario, para el uso en la amplificación lineal de la transcripción. Más del 99,5% de las secuencias amplificadas en las reacciones de RAMP muestran una variabilidad de < 2 veces y, por lo tanto, la RAMP proporciona muestras de RNA sin sesgo en cantidad suficiente para permitir el descubrimiento de secuencias de mRNA únicas implicadas en la osteoclastogénesis.

D.- Preparación de una genoteca sustractiva de osteoclastos humanos

Dos células precursoras primarias humanas de dos donantes diferentes (Cambrex, East Rutherford, NJ) y los osteoclastos correspondientes intermedios (día 3 y día 7) y maduros (días 11 a 14) se prepararon como se describe más arriba. El aislamiento del RNA celular seguido de la purificación del mRNA de cada uno se realizó mediante los procedimientos estándares (Qiagen, Mississauga, ON). Siguiendo las enseñanzas de Malek et al. (patente de los EE.UU. n.º 5 712 127), se utilizaron 2 µg de mRNA poli-A+ de cada muestra para preparar genotecas de cDNA muy representativas (> 2 x 10⁶ UFC) en vectores plasmídicos especializados necesarios para preparar materiales del problema y del sustractor. En cada caso, la primera cadena de cDNA se sintetizó con un cebador de oligo-dT₁₁ con nucleótidos de cierre en 3' (p. ej., A, G o C) y que contiene un sitio de reconocimiento para NotI. A continuación se sintetizó la segunda cadena del cDNA de acuerdo con el procedimiento del fabricante para la síntesis de cDNA bicatenario (Invitrogen, Burlington, ON) y el cDNA bicatenario resultante se ligó a los conectores que contenían un sitio de reconocimiento para Ascl (New England Biolabs, Pickering, ON). Luego, los cDNA bicatenarios se digirieron con las enzimas de restricción Ascl y NotI (New England Biolabs, Pickering, ON), se purificaron del exceso de

conectores mediante una columna de fraccionamiento del cDNA de Invitrogen (Burlington, ON) como especifica el fabricante y se ligó cada uno en vectores plasmídicos especializados: p14 (SEQ ID n.º 36) y p17+ (SEQ ID n.º 37) utilizados para preparar los materiales del problema y del sustractor, respectivamente. A partir de aquí, los cDNA ligados se introdujeron por transformación en *E. coli* DH10B para dar lugar a las genotecas de cDNA deseadas (RAW 264.7-precursor-p14, RAW 264.7-precursor-p17+, RAW 264.7-osteoclastos-p14 y RAW 264.7-osteoclastos-p17+). Se purificó el conjunto de DNA plasmídico de cada genoteca de cDNA y se linealizaron alícuotas de 2 µg de cada uno con la enzima de restricción NotI. Entonces se realizó la transcripción *in vitro* de las genotecas plasmídicas en p14 y p17+ digeridas con NotI mediante la RNA polimerasa de T7 y la RNA polimerasa de SP6, respectivamente (Ambion, Austin, TX).

Después, para preparar las genotecas del problema y del sustractor con representación del 3', una alícuota de 10 µg de cada uno de los RNA sintetizados *in vitro* se convirtió en cDNA bicatenario mediante la síntesis de la primera cadena del cDNA como se describe más arriba seguido de la síntesis de la segunda cadena del DNA dirigida por cebadores [cebador OGS 77 para p14 (SEQ ID n.º 40) y cebador OGS 302 para p17+ (SEQ ID n.º 41)] mediante la Taq polimerasa Advantage-2 (BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON). Las secuencias que corresponden a OGS 77 y OGS 302 se introdujeron en el RNA sintetizado *in vitro* por medio de los vectores especializados utilizados para preparar las genotecas de cDNA. A continuación se digirieron 6 alícuotas de 1 µg de cada cDNA bicatenario por separado con una de las siguientes enzimas de restricción que reconocen 4 bases RsaI, Sau3A1, MseI, MspI, MinPII y Bsh1236I (MBI Fermentas, Burlington, ON), lo que produce hasta seis posibles fragmentos en 3' para cada una de las especies de RNA contenidas en la genoteca de cDNA. Después de la digestión, las enzimas de restricción se inactivaron con fenol y se agrupó el conjunto de seis reacciones. Entonces, los sitios de las enzimas de restricción se hicieron romos con la DNA polimerasa de T4 y se ligaron a conectores que contenían un sitio de reconocimiento para Ascl. Cada muestra de DNA agrupada adaptada con el conector se digirió con las enzimas de restricción Ascl y NotI, se desalaron y se ligaron a los vectores plasmídicos especializados p14 y p17 (el vector plasmídico p17 es similar al vector plasmídico p17+, salvo la parte de la secuencia corresponde a SEQ ID n.º 41) y se introdujeron por transformación en *E. coli* DH10B. Se purificó (Qiagen, Mississauga, ON) el conjunto de DNA plasmídico para cada genoteca de representación de 3' en p14 y p17 y se digirió con la enzima de restricción NotI una alícuota de 2 µg de cada uno, y se transcribió *in vitro* bien con la RNA polimerasa de T7 o con la RNA polimerasa de SP6 (Ambion, Austin, TX). El RNA de representación de 3' en p14 se utilizó directamente como «RNA problema», mientras que el RNA de representación de 3' en p17 se utilizó para sintetizar el cDNA monocatenario como se describe más arriba, que luego se sirvió como «DNA sustractor». Cada reacción con el «DNA sustractor» se trató con RNasa A y RNasa H para retirar el RNA, se extrajeron con fenol y se desalaron antes de su uso.

Se prepararon las siguientes genotecas de representación de 3':

Problema 1 (donante 1 – osteoclasto intermedio humano a día 3)-3' en p14

Problema 2 (donante 1 – osteoclasto intermedio humano a día 7)-3' en p14

35 Problema 3 (donante 1 – osteoclasto maduro humano a día 11)-3' en p14

Problema 4 (donante 2 – osteoclasto intermedio humano a día 3)-3' en p14

Problema 5 (donante 2 – osteoclasto intermedio humano a día 7)-3' en p14

Problema 6 (donante 2 – osteoclasto maduro humano a día 13)-3' en p14

Sustractor 1 (donante 1– precursor humano a día 3)-3' en p17

40 Sustractor 2 (donante 2 – precursor humano a día 3)-3' en p17

Las muestras del RNA problema se sustrajeron siguiendo las enseñanzas de la patente de los EE.UU. n.º 5 712 127 con el correspondiente DNA sustractor en una proporción de 1:100 para 1 o 2 rondas siguiendo las enseñanzas de Malek et al. (patente de los EE.UU. n.º 5 712 127). Adicionalmente se prepararon las reacciones de control que contenían el RNA problema y ningún DNA sustractor, y el RNA problema más el DNA sustractor sin RNasa H. El RNA problema restante en cada reacción después de la sustracción se convirtió en DNA bicatenario, y se retiró un volumen del 5% y se amplificó en una reacción de PCR estándar durante 30 ciclos para propósitos analíticos. El restante 95% que tenía sólo el sustractor más las muestras sustractivas con RNasa H se amplificó 4 ciclos por PCR, se digirió con las enzimas de restricción Ascl y NotI, y se ligó una mitad con el vector plasmídico pCATRMAN (SEQ ID n.º 38) y la otra mitad con el vector plasmídico p20 (SEQ ID n.º 39). Los materiales ligados se introdujeron por transformación en *E. coli* DH10B y los distintos clones contenidos en las genotecas en pCATRMAN se recogieron para analizarlas más (secuenciación e hibridación del DNA), mientras que los clones contenidos en cada genoteca en p20 se agruparon para su uso como sondas sustractivas. Cada genoteca sustractiva clonada y amplificada 4 ciclos contenía entre 25 000 y 40 000 colonias.

Se prepararon las siguientes genotecas sustractivas clonadas:

55 SL90: problema 1 (osteoclasto a día 3) menos sustractor 1 (precursor) (1 ronda) en pCATRMAN;

SL91: problema 2 (osteoclasto a día 7) menos sustractor 1 (precursor) (1 ronda) en pCATRMAN;

SL92: problema 3 (osteoclasto a día 11) menos sustractor 1 (precursor) (1 ronda) en pCATRMAN;

SL108: problema 1 (osteoclasto a día 3) menos sustractor 1 (precursor) (2 rondas) en pCATRMAN;

SL109: problema 2 (osteoclasto a día 7) menos sustractor 1 (precursor) (2 rondas) en pCATRMAN;

5 SL110: problema 3 (osteoclasto a día 11) menos sustractor 1 (precursor) (2 rondas) en pCATRMAN;

SL93: problema 4 (osteoclasto a día 3) menos sustractor 2 (precursor) (1 ronda) en pCATRMAN;

SL94: problema 5 (osteoclasto a día 7) menos sustractor 2 (precursor) (1 ronda) en pCATRMAN;

SL95: problema 6 (osteoclasto a día 13) menos sustractor 2 (precursor) (1 ronda) en pCATRMAN;

SL87: problema 4 (osteoclasto a día 3) menos sustractor 2 (precursor) (2 rondas) en pCATRMAN;

10 SL88: problema 5 (osteoclasto a día 7) menos sustractor 2 (precursor) (2 rondas) en pCATRMAN;

SL89: problema 6 (osteoclasto a día 11) menos sustractor 2 (precursor) (2 rondas) en pCATRMAN

15 Una alícuota de 5 µl de los materiales sustractivos amplificados por PCR de 30 ciclos descritos más arriba se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5% que contenía bromuro de etidio y luego se transfirieron a una membrana de nilón Hybond N+ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) para el análisis de transferencia Southern. Mediante el uso de sondas radiomarcadas específicas del gen CTSK (catepsina K: NM_000396.2), que se sabe que está inducido en los osteoclastos, y la GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; M32599.1), que es un gen de mantenimiento que no se expresa diferencialmente, fue evidente que había sustracción de la GAPDH, pero no de la CTSK. Basándose en estos resultados, se anticipó que la genotecas sustraídas estaban enriquecidas en las secuencias inducidas de expresión diferencial.

20 E.- Identificación de las secuencias y anotación de los clones contenidos en las genotecas sustractivas:

25 Se recogieron aleatoriamente en 60 µl de agua esterilizada 6912 colonias independientes contenidas en las genotecas sustraídas en pCATRMAN (SL87-95 y SL108-110) descritas más arriba mediante el uso de un Qbot (Genetix Inc., Boston, MA). A continuación, 42 µl de cada una se utilizaron en una reacción de PCR estándar de 100 µl que contenía los cebadores oligonucleotídicos OGS 1 y OGS 142 y se amplificaron durante 40 ciclos [94 °C durante 10 minutos, 40x (94 °C durante 40 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 2 min) seguido de 72 °C durante 7 min] en placas de microtitulación de 96 pocillos mediante la Taq polimerasa HotStart™ (Qiagen, Mississauga, ON). Las reacciones de PCR completadas se desalaron en placas de filtro de 96 pocillos (Corning) y se recuperaron los amplicones en 100 µl de Tris a 10 mM (pH 8,0). Una alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1,5% que contenía bromuro de etidio y se seleccionaron sólo las reacciones que contenían un único producto amplificado para analizarles la secuencia del DNA mediante la secuenciación estándar de DNA realizada en un instrumento ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A cada secuencia de DNA obtenida se le dio un número de identificación de secuencia y se introdujo en una base de datos para el posterior rastreo y anotación.

30 Cada secuencia se sometió al análisis de BLAST con bases de datos públicas (p. ej., NCBI). Entre estas secuencias no se encontraban los genes de mantenimiento estándares (GAPDH, actina, la mayoría de proteínas ribosómicas, etc.), lo cual era una buena indicación de que la genoteca sustractiva carecía de al menos las secuencias relativamente abundantes que no se expresaban diferencialmente.

35 Una vez que se completó la secuenciación y anotación de los clones seleccionados, la siguiente etapa implicó la identificación de las secuencias que estaban realmente inducidas en los osteoclastos en comparación con los precursores.

40 F.- Análisis de hibridación para identificar secuencias inducidas

45 Los amplicones de PCR que representan las secuencias anotadas de las genotecas en pCATRMAN descritas más arriba se utilizaron para preparar micromatrices de DNA. Se liofilizaron los amplicones de PCR purificados contenidos en 70 µl de las reacciones de PCR preparadas en el apartado anterior y cada uno se reconstituyó en 20 µl de la solución de depósito que comprende SSC a 3X y sarcosil al 0,1%. Entonces se prepararon las micromatrices de DNA de cada amplicón por triplicado sobre soportes CMT-GAP2 (Corning, Corning, NY) mediante el depositador GSM 417 (Affymetrix, Santa Clara, CA).

50 A continuación, las micromatrices de DNA se hibridaron con sondas de cDNA marcadas con cy3 y cy5 sustractivas o estándares, como recomienda el proveedor (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las sondas de cDNA estándares se sintetizaron a partir del RNA amplificado con RAMP preparado de las diferentes muestras de osteoclastos humanos y los correspondientes precursores. El experto en la técnica sabe perfectamente que las sondas de cDNA estándares sólo proporcionan una escasa sensibilidad de detección y, en consecuencia, las

secuencias poco abundantes contenidas en las sondas de cDNA no se suelen detectar. Así pues, el análisis de hibridación también se realizó con sondas de cDNA sustractivas marcadas con cy3 y cy5 obtenidas de genotecas sustractivas que representan los diferentes materiales problema y sustractor. Estas genotecas sustractivas pueden estar enriquecidas en las secuencias poco abundantes como resultado de seguir las enseñanzas de Malek et al., y por lo tanto, pueden proporcionar una mayor sensibilidad de detección.

Todas las reacciones de hibridación se realizaron mediante el procedimiento de intercambio de fluoróforos como recomienda el proveedor (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y para el análisis posterior se seleccionaron aproximadamente 500 secuencias inducidas (> 2 veces) de posible expresión diferencial.

G.- Determinación de la especificidad de osteoclasto para las secuencias expresadas diferencialmente que se han identificado:

Las secuencias expresadas diferencialmente identificadas en el apartado F para las diferentes genotecas sustractivas de osteoclastos humanos se comprobó si eran específicas de osteoclasto mediante la hibridación a macromatrices basadas en la membrana de nilón. Las macromatrices se prepararon con el RNA amplificado con RAMP a partir de precursores y osteoclastos (intermedios y maduros) humanos de seis experimentos independientes de 4 donantes diferentes (3 varones y 1 mujer) y 30 tejidos humanos normales (glándula suprarrenal, hígado, pulmón, ovario, músculo esquelético, corazón, cuello, tiroides, mama, placenta, corteza suprarrenal, riñón, vena cava, trompa de Falopio, páncreas, testículo, yeyuno, aorta, esófago, próstata, estómago, bazo, ileon, tráquea, cerebro, colon, timo, intestino delgado, vejiga y duodeno) comprados en el mercado (Ambion, Austin, TX). Debido a la poca cantidad de mRNA disponible para muchas de estas muestras, fue necesario primero amplificar el mRNA mediante la metodología RAMP. Cada muestra de RNA amplificado se reconstituyó a una concentración final de 250 ng/μl en SSC a 3X y sarcosil al 0,1% en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se depositó 1 μl sobre membranas de nilón Hybond N+ mediante el aparato MULTIPRINT™ (VP Scientific, San Diego, CA), se secó al aire y se entrecruzó con luz UV. Se radiomarcaron por separado con α-³²P-dCTP 400 secuencias diferentes seleccionadas entre L87-95 y SL108-110 mediante el procedimiento de cebado aleatorio recomendado por el proveedor (Amersham, Piscataway, NJ) y se utilizaron como sondas en las macromatrices. Las etapas de hibridación y lavado se realizaron siguiendo los procedimientos estándares bien conocidos por los expertos en la técnica.

De las 500 secuencias ensayadas, aproximadamente el 85% se encontró que estaban inducidas en todas las muestras de RNA de osteoclastos que se utilizaron para preparar las macromatrices. Sin embargo, muchas de estas secuencias se detectaron también con facilidad en la mayoría de los tejidos humanos normales diferentes. Basándose en estos resultados, se eliminaron las secuencias que parecían estar asociadas a la variabilidad experimental y las que se detectaron en muchos de los demás tejidos humanos a un nivel significativamente elevado. En consecuencia, para los estudios de validación biológica sólo se seleccionaron las 35 secuencias que parecían estar inducidas y ser muy específicas de los osteoclastos. En este conjunto de 35 genes se incluyen 4 (SEQ ID n.º 30-33) en los que se detectó una inducción significativa en los osteoclastos maduros en comparación con la mayoría de los tejidos normales, pero dado que la expresión de estos genes era en conjunto menor en las células precursoras, parecieron aumentar en los tejidos normales después de la cuantificación (figura 30-33, gráfico de barras). Sin embargo, su expresión en los tejidos normales era todavía relativamente más baja que en los osteoclastos maduros. Así pues, estos genes pueden ser todavía reguladores importantes de la osteoclastogénesis y de la osteoclastia y, por lo tanto, se seleccionaron para la validación biológica. Este subconjunto de 35 secuencias no incluía otros genes que ya se habían identificado, tales como CTSK, TRAP, MMP9, CST3 y CKB entre otros, dado que en la bibliografía ya se había descrito previamente que se inducían en los osteoclastos. Los datos de las macromatrices para CST3 (SEQ ID n.º 34) se incluyen para ejemplificar el patrón de hibridación y la especificidad de un gen que ya se sabe que es un regulador clave del proceso de resorción de los osteoclastos. Un gen (ANKH; SEQ ID n.º 17) se incluyó en el subconjunto de 35 genes aunque estaba descrito previamente en las bases de datos (NCBI-Gene) que su función estaba en la mineralización ósea. Sin embargo, el fenotipo óseo observado como resultado de las mutaciones en el gen ANKH no estaba conectado específicamente a su inducción en los osteoclastos. Así pues, nuestros datos sugieren que la importante función de ANKH puede estar asociada a la actividad de los osteoclastos durante la remodelación ósea.

Las figuras 1-33, 38 y 39 muestran los patrones de las macromatrices y la cuantificación de las señales de hibridación de los osteoclastos y los tejidos humanos normales respecto a células precursoras para las 35 secuencias seleccionadas para la validación biológica. Entre las 35 secuencias seleccionadas había 24 genes con una anotación funcional, 9 genes sin ninguna anotación funcional y 2 secuencias nuevas (hitos genómicos). La identificación de los productos génicos implicados en la regulación de la diferenciación y del funcionamiento de los osteoclastos ha conducido pues al descubrimiento de nuevas dianas para el desarrollo de nuevos tratamientos específicos de estados patológicos caracterizados por la remodelación ósea anormal. Las secuencias representativas recogidas en la tabla 1 se presentan a continuación y las correspondientes secuencias se ilustran en la tabla 5.

SEQ ID n.º 1:

La SEQ ID n.º 1 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína hipotética, LOC284266 de función desconocida (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido

en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 1), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 2:

- 5 La SEQ ID n.º 2 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica un marco abierto de lectura predicho, C6orf82, de función desconocida (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 2), lo que no se había descrito anteriormente. Se han identificado hasta ahora al menos 5 variantes de transcripción de este gen que codifican las 3 isoformas proteicas que se
10 habían identificado hasta ahora (NCBI). Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 3:

- 15 La SEQ ID n.º 3 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína hipotética, LOC133308, de función desconocida (véase la tabla 1), pero que puede estar implicado en el proceso de regulación del pH. Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 3), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 4:

- 20 La SEQ ID n.º 4 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína hipotética, LOC116211, de función desconocida (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 4), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, está implícito que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

25 SEQ ID n.º 5:

- La SEQ ID n.º 5 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína predicha, LOC151194 (similar al antígeno HCA557b asociado al carcinoma hepático), de función desconocida (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 5), lo que no se había descrito anteriormente. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.
30

SEQ ID n.º 6:

- 35 La SEQ ID n.º 6 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, el ligando 5 de quimiocinas con motivo C-X-C (CXCL5), que es una quimiocina inflamatoria que pertenece a la familia de las quimiocinas CXC (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 6), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 7:

- 40 La SEQ ID n.º 7 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, ATPasa, la proteína accesoria lisosómica 2 transportadora de H⁺ (ATP6AP2), que está asociada a las adenosina trifosfatasa (ATPasas). Las ATPasas transportadoras de protones tienen funciones fundamentales en la conservación de la energía, en el transporte activo secundario, en la acidificación de los compartimentos intracelulares y en la homeostasis del pH celular (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los
45 osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 7), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 8:

- 50 La SEQ ID n.º 8 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la proteína 1 de tipo proteasa 12 específica de ubiquitina (USP12), que está asociada al catabolismo proteico dependiente de la ubiquitina (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 8), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 9:

La SEQ ID n.º 9 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la isoforma 1 de la enzima E2E de conjugación a la ubiquitina (homóloga de UBC4/5, levadura) (UBE2E1), que está asociada al catabolismo proteico dependiente de la ubiquitina (véase la tabla 1). Hasta ahora se han descrito 2 variantes de transcripción e isoformas de la proteína para este gen. Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 9), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 10:

La SEQ ID n.º 10 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la proteína de tipo proteína fijadora de emopamilo (EBPL), que puede tener actividad colestenol Δ -isomerasa (véase tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 10), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 11

La SEQ ID n.º 11 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, el factor 1 potenciador de la diferenciación y del desarrollo (DDEF1), que puede estar implicado en la movilidad y en la adhesión celulares (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 11), lo que no se había descrito anteriormente. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 12

La SEQ ID n.º 12 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, el miembro 7 de la familia SLAM (SLAM7), que puede tener actividad receptora y estar implicado en la adhesión celular, pero todavía no está caracterizado completamente (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 12), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 13

La SEQ ID n.º 13 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la enzima E2E 3 de conjugación a la ubiquitina (homólogo a UBC4/5, levadura) (UBE2E3), que está asociada al catabolismo proteico dependiente de la ubiquitina (véase la tabla 1). Hasta ahora se han documentado 2 variantes de transcripción, que codifican la misma isoforma de la proteína. Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 1), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 14

La SEQ ID n.º 14 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, galanina (GAL), que está asociada a la actividad de hormona neuropeptídica (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales excepto para el colon (figura 14), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 15

La SEQ ID n.º 15 (tabla 15) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, el factor n-pac nuclear de tipo citocina (N-PAC), que puede tener actividad oxidorreductasa (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 15), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, se observó algo de sobreexpresión de este gen, aunque por debajo de la de los osteoclastos maduros, en corazón, trompa de Falopio, bazo y cuello de útero. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 16

La SEQ ID n.º 16 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la integrina α X (antígeno CD11C (p150), polipéptido α) (ITGAX), que está implicada en la adhesión celular y en la fijación de iones

(véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 16), lo que no se había descrito anteriormente. Se observa que este gen presenta una expresión mínima, aunque mucho más baja que en los osteoclastos maduros, en la glándula suprarrenal, pulmón y bazo entre los tejidos normales. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 17:

La SEQ ID n.º 17 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, homóloga de la anquilosis progresiva (ratón) (ANKH), que está implicada en la regulación de los niveles de pirofosfato, y se sugiere que es un posible mecanismo de regulación de la calcificación del tejido (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 17), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, se ha descrito que este gen está implicado en la mineralización ósea, pero sin pruebas de su inducción en los osteoclastos (Malkin et al., 2005). Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 18:

La SEQ ID n.º 18 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, ATPasa, V1 subunidad A transportadora de H⁺ y lisosómica de 70 kDa, que está implicada en un mecanismo rotacional de actividad ATPasa transportadora de hidrógeno (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 18), lo que no se había descrito anteriormente. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 19

La SEQ ID n.º 19 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica un marco abierto de lectura que codifica la proteína FLJ10874 (marco abierto de lectura 75 del cromosoma 1), que no tiene una función conocida (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 19), lo que no se había descrito anteriormente. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 20

La SEQ ID n.º 20 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la proteína 1 fijadora de la integrina β 1 (ITGB1BP1), que tiene una función importante durante la adhesión celular dependiente de integrinas (véase la tabla 1). Se han aislado dos variantes de transcripción e isoformas de la proteína para este gen. Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 20), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 21:

La SEQ ID n.º 21 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la tipo tiorredoxina 5 (TXNL5), que no tiene una función conocida (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales con la excepción del esófago (figura 21), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 22

La SEQ ID n.º 22 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, el miembro E de la familia 4 de las lectinas de tipo C (CLECSF9), que no tiene una función específica conocida (véase la tabla 1). Los miembros de esta familia comparten un plegamiento proteico común y tienen funciones diversas, tal como adhesión celular, señalización intercelular, recambio de glucoproteínas y funciones en la inflamación y la respuesta inmunitaria. Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales, con la excepción del pulmón y el bazo (figura 22), lo que no se había descrito anteriormente. En este punto, no podemos descartar la hibridación cruzada con miembros de la familia en el pulmón y en el bazo. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 23

La SEQ ID n.º 23 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, RAB33A, miembro de la familia del oncogén RAS (RAB33A), que tiene actividad GTPasa (véase la tabla 1). Hemos

demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales con la excepción del cerebro (figura 23), lo que no se había descrito anteriormente. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

5 SEQ ID n.º 24

La SEQ ID n.º 24 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, el gen 1 de la región crítica del síndrome de Down (DSCR1), que interacciona con la calcineurina A e inhibe las vías de señalización dependientes de la calcineurina, lo que posiblemente afecta al desarrollo del sistema nervioso central (véase la tabla 1). Hay 3 variantes de transcripción e isoformas proteicas aisladas hasta la fecha. Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 24), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 25

15 La SEQ ID n.º 25 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la proteína Ykt6 (YKT6) del grupo SNARE, que es una de las moléculas SNARE de reconocimiento implicadas en el transporte vesicular entre los compartimentos secretores (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 25), lo que no se había descrito anteriormente. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 26

25 La SEQ ID n.º 26 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la actinina $\alpha 1$ (ACTN1), que es citoesquelética y está implicada en la fijación y la adhesión de la actina (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 26), lo que no se había descrito anteriormente. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 27

30 La SEQ ID n.º 27 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, el homólogo X de la peptidasa caseinolítica ClpX (E. coli) (CLPX), que puede estar implicada en el recambio proteico (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 27), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

35 SEQ ID n.º 28

La SEQ ID n.º 28 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la anhidrasa carbónica II (CA2), que tiene actividad carbonato deshidratasa (véase la tabla 1). La falta de esta enzima está asociada a la osteopetrosis y a la acidosis tubular renal (McMahon et al., 2001) y se ha demostrado que está inducida en los osteoclastos maduros en condiciones de pH ácido inducido (Biskobing y Fan, 2000). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras independientemente de las condiciones de pH ácido inducido y de los otros tejidos humanos normales (figura 28), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, también se observó la elevada expresión de este gen en el colon y en el estómago, pero todavía significativamente por debajo del nivel en los osteoclastos maduros. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 29

50 La SEQ ID n.º 29 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la nexina 10 clasificadora (SNX10), cuya función no se ha determinado (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y la mayor parte de los tejidos humanos normales (figura 29), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, también se observó la elevada expresión de este gen en el hígado, cerebro, pulmón, corteza suprarrenal, riñón y bazo, aunque significativamente por debajo del nivel en los osteoclastos maduros. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 30

La SEQ ID n.º 30 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, que contiene 3 dominios Tudor (TDRD3), cuya función no se ha determinado, pero que puede estar implicada en la fijación a ácidos nucleicos (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos maduros en comparación con las células precursoras y la mayoría de los tejidos humanos normales (figura 30), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, se observó expresión de este gen por encima del nivel basal en los tejidos humanos normales debido a que el precursor estaba más bajo de lo normal, aunque todavía estaba significativamente por debajo del nivel en los osteoclastos maduros. Por lo tanto, se mantuvo la selección de este gen. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 31

La SEQ ID n.º 31 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la selenoproteína P, plasma, 1 (SEPP1), que se ha implicado en la defensa oxidante en el espacio extracelular y en el transporte de selenio (véase la tabla 1). Este gen codifica una selenoproteína que contiene varias selenocisteínas. La selenocisteína está codificada por el codón UGA que suele ser de parada. Los aminoácidos inusuales están señalados con una «U» en la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID n.º 78 (tabla 5) o mediante Xaa en la lista de secuencias. Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y la mayoría de los tejidos humanos normales (figura 31), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, se observó la expresión de este gen por encima del nivel basal en los tejidos humanos normales debido a que el nivel del precursor era más bajo de lo normal, pero era todavía significativamente menor que el nivel en los osteoclastos maduros. Por consiguiente, se mantuvo la selección de este gen. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 32

La SEQ ID n.º 32 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína hipotética, KIAA0040, que no tiene ninguna función conocida (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y la mayoría de los tejidos humanos normales (figura 32), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, se observó la expresión de este gen por encima del nivel basal en los tejidos humanos normales debido a que el nivel del precursor era más bajo de lo normal, pero era todavía significativamente menor que el nivel en los osteoclastos maduros. Por consiguiente, se mantuvo la selección de este gen. Por lo tanto, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 33

La SEQ ID n.º 33 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la dipeptidilpeptidasa 4 (CD26, proteína 2 del complejo de la adenosina desaminasa) (DPP4), que es una glucoproteína intrínseca de la membrana y una serina exopeptidasa que escinde los dipéptidos de X-prolina desde el extremo amino de los polipéptidos (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y la mayoría de los tejidos humanos normales (figura 33), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, se observó la expresión de este gen por encima del nivel basal en los tejidos humanos normales, excepto en la placenta, pulmón, ovario, riñón, próstata e intestino delgado, debido a que el nivel del precursor era más bajo de lo normal, pero era todavía significativamente menor que el nivel en los osteoclastos maduros. Por consiguiente, se mantuvo la selección de este gen. Por consiguiente, se cree que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 34:

La SEQ ID n.º 34 (tabla 5) corresponde a un gen previamente identificado que codifica una proteína, la precursora de la cistatina C, y se sabe que miembros de la familia de la cistatina son inhibidores de las cisteína proteasas (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 34), lo que no se había descrito anteriormente. Sin embargo, está bien documentado que la cistatina C desempeña una función crítica a la hora de inhibir la osteoclastia debida a los osteoclastos (Brage et al., 2005). Por lo tanto, el perfil de hibridación de este gen es un ejemplo excelente de las secuencias muy inducidas y específicas relacionadas con los osteoclastos.

SEQ ID n.º 85:

La SEQ ID n.º 85 (tabla 5) codifica una proteína desconocida que se encuentra en el cromosoma 1 (clon RP11-344F13), que contiene un gen nuevo (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está notablemente inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 38), lo que no se había descrito anteriormente. Por consiguiente, se deduce que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

SEQ ID n.º 86

La SEQ ID n.º 86 (tabla 5) no codifica ninguna proteína conocida. Se trata de un gen desconocido que coincide con la secuencia de una EST que corresponde a BQ182670 en la base de datos y que se aisló de una muestra de cartílago artrósico (véase la tabla 1). Hemos demostrado que este gen está muy inducido en los osteoclastos intermedios y maduros en comparación con las células precursoras y los otros tejidos humanos normales (figura 39), lo que no se había descrito anteriormente. Por lo tanto, se deduce que este gen podría ser necesario para la osteoclastogénesis y/o la remodelación ósea.

H.- Clonación de los cDNA completos de las secuencias seleccionadas entre los mRNA de osteoclasto:

Era necesario obtener secuencias de cDNA completos para realizar estudios funcionales de las proteínas expresadas. Cada vez hay más variantes de ajuste implicadas en las funciones específicas del tejido y, como tal, es importante trabajar con clones de cDNA del sistema en estudio. El solicitante también reconoce que las variantes de ajuste no siempre intervienen en ello. Por lo tanto, la estrategia del solicitante ha sido aislar las secuencias de cDNA completos y relevantes directamente de los osteoclastos para identificar las variantes y su posible función con respecto a la especificidad.

Los clones de cDNA codificantes se aislaron con una estrategia 5'-RACE (Invitrogen, Burlington, ON) y una estrategia estándar específica del gen con dos cebadores de PCR. La estrategia 5'-RACE utilizó el cDNA preparado a partir de RNA de osteoclastos seleccionado por la caperuza y/o RNA de osteoclastos amplificado con RAMP. Para la amplificación con cebadores específicos del gen, se utilizó tanto el cDNA preparado de RNA con RAMP como RNA total. Todos los cDNA se sintetizaron siguiendo los procedimientos de transcripción inversa estándares (Invitrogen, Burlington, ON). Las secuencias de cDNA obtenidas se clonaron en *E. coli* DH10B y se determinó la secuencia nucleotídica de varios clones. Después, las secuencias de los cDNA de cada conjunto se alinearon y se identificó el o los marcos abiertos de lectura (ORF, por su nombre en inglés) con programas informáticos estándares (p. ej, ORF Finder-NCBI). La tabla 2 muestra la secuencia consenso de los clones de cDNA de la región codificante de SEQ ID n.º 1 (SEQ ID n.º 83) y SEQ ID n.º 2 (SEQ ID n.º 84) obtenidos de una muestra de los osteoclastos humanos, que son idénticas a las de las secuencias publicadas que corresponden a los números de acceso NM_213602 y NM_001014433 (NCBI), respectivamente.

I.- Estudios de interferencia por RNA

La interferencia por RNA es un mecanismo de regulación génica recientemente descubierto que implica la disminución, específica de secuencia, de la expresión de un gen al dirigir el mRNA hacia la degradación y, aunque se describió originalmente en las plantas, se ha descubierto en muchos reinos animales, desde los protozoos e invertebrados hasta los eucariotas superiores (revisado en Agrawal et al., 2003). En el contexto fisiológico, el mecanismo de interferencia por RNA lo desencadena la presencia de moléculas de RNA bicatenario que se escinden mediante una proteína de tipo RNasa III activa en las células, denominada Dicer, que libera los siRNA de 21 a 23 pb. El siRNA, de una manera guiada por la homología, forma un complejo con una amalgama de proteínas y RNA denominada RISC (complejo silenciador inducido por RNA) en presencia de mRNA para provocar la degradación, lo que da lugar a la atenuación de la expresión de este mRNA (Agrawal et al., 2003).

Las estrategias actuales para estudiar la función de los genes, tal como los ratones genosuprimidos y los negativos dominantes, a menudo son ineficaces y generalmente caros, y necesitan mucho tiempo. La interferencia por RNA está resultando ser un procedimiento de elección para el análisis de un gran número de genes de una manera rápida y relativamente barata. Aunque la transfección de los siRNA sintéticos es un método eficaz, los efectos a menudo son transitorios en el mejor de los casos (Hannon G. J, 2002). La introducción de plásmidos que expresan RNA ahorquillados pequeños mediante la transfección estable ha resultado satisfactoria al permitir el análisis mediante interferencia por RNA en los estudios a largo plazo (Brummelkamp et al., 2002; Elbashir et al., 2001). Además, los avances más recientes han permitido la expresión de moléculas de siRNA, en forma de RNA ahorquillado pequeño, en células humanas primarias mediante procedimientos que usan virus, tal como lentivirus, para introducirlos (Lee et al., 2004; Rubinson et al., 2003).

J.- Determinación de los efectos bloqueadores de la osteoclastogénesis

Para desarrollar un procedimiento de escrutinio para los genes candidatos humanos, la interferencia por RNA se adaptó para introducir shRNA en las células precursoras de osteoclastos humanos, por lo que se pudo atenuar la expresión de los genes candidatos. Esta estrategia permitiría entonces realizar la diferenciación de los osteoclastos en las células que contienen una menor expresión de estos genes para determinar si son necesarios, o no, en el procedimiento.

Para este fin se utilizó un sistema comercial de suministro de shRNA con lentivirus (Invitrogen, Burlington, ON) para introducir shRNA específicos en las células precursoras de osteoclastos humanos. Las técnicas utilizadas fueron las descritas por el fabricante, a menos que se indique otra cosa. En este ejemplo se presentan los resultados obtenidos para dos de los genes candidatos, SEQ ID n.º 1 (AB0326) y SEQ ID n.º 2 (AB0369) ensayados hasta la fecha. Las proteínas codificadas por ambos genes no tienen una función conocida. Las secuencias de shRNA utilizadas para dirigir específicamente la SEQ ID n.º 1 y la SEQ ID n.º 2 fueron 5'-CAGGCCAGGAGTCCAATT-3' (SEQ ID n.º 42) y 5'-

TCCCGTCTTTGGGTCAAAA-3' (SEQ ID n.º 43), respectivamente. Brevemente, en el vector de expresión en lentivirus se clonó una plantilla para la expresión del shRNA y se cotransfectó en las células 293FT con vectores de expresión para las proteínas estructurales del virus. Después de dos días, los sobrenadantes que contenían el lentivirus se recogieron y se conservaron a -80 °C. Los precursores de los osteoclastos humanos que se compraron a Cambrex (East Rutherford, NJ) se sedimentaron en placas de 24 pocillos y se cultivaron en medio completo con el factor estimulador de colonias de macrófagos y se dejó que se adhirieran durante tres días. Después del lavado con PBS, las células se infectaron a una MDI (multiplicidad de infección) de 20 con partículas lentivíricas que contienen un shRNA específico para el gen lacZ bacteriano como control (shRNA de lacZ), o bien con la SEQ ID n.º 1 (shRNA de AB0326) o la SEQ ID n.º 2 (shRNA de AB0369). Después de 24 horas, las células infectadas se trataron con el mismo medio que contenía el ligando de RANK a 100 ng/ml durante 5 a 8 días para permitir la diferenciación del osteoclasto a partir de las células precursoras. Los osteoclastos maduros se fijaron con formaldehído y se tiñeron para detectar la expresión de TRAP como sigue: las células se lavaron con PBS y se fijaron en formaldehído al 10% durante 1 hora. Después de dos lavados con PBS, las células se permeabilizaron ligeramente en Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 5 minutos antes del lavado en PBS. La tinción se llevó a cabo a 37 °C durante 20 a 25 min en fosfato de naftol AS-MX al 0,01%, Fast Red Violet al 0,06%, tartrato de sodio a 50 mM, acetato de sodio a 100 mM, pH 5,2. Las células teñidas se visualizaron con el microscopio óptico y se fotografiaron (aumentos: 40X). Se observó una disminución significativa del número de osteoclastos multinucleados a partir de las células precursoras infectadas con el shRNA de AB0326 (figura 35A, panel inferior) y con el shRNA de AB0369 (figura 35B, panel inferior) en comparación con las que se producen con el shRNA de lacZ (figuras 35A y B, paneles superiores). Por consiguiente, en ambos casos, el shRNA lentivírico correspondiente (SEQ ID n.º 42 y 43, respectivamente) (tabla 4) perturbó la osteoclastogénesis. Estos resultados indicaban con claridad que la expresión del gen que codifica la SEQ ID n.º 1 (AB0326) y la SEQ ID n.º 2 (AB0369) es necesaria para la diferenciación de los osteoclastos.

Se llevaron a cabo experimentos similares a los descritos más arriba con otras secuencias (SEQ ID n.º 3 a SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86).

K.- Validación biológica del ortólogo de ratón para AB0326 (SEQ ID n.º 35) en la osteoclastogénesis con el modelo RAW 264.7

Como un medio para desarrollar un ensayo de escrutinio de fármacos para el descubrimiento de moléculas terapéuticas capaces de atenuar la diferenciación y la actividad de los osteoclastos humanos mediante las dianas identificadas, fue necesario utilizar otro modelo de diferenciación de los osteoclastos. La línea de las células precursoras de osteoclastos RAW 264.7 (RAW) se conoce bien en la técnica como modelo murino de la osteoclastogénesis. Sin embargo, debido a la dificultad para la transfección transitoria de las células RAW, se utilizó la estrategia de transfección estable, donde los shRNA se expresan constitutivamente en las células RAW. Esto permitió llevar a cabo estudios a largo plazo tales como la diferenciación de los osteoclastos en presencia de determinados shRNA identificados por ser específicos de los ortólogos murinos de las dianas humanas.

Las células RAW se compraron a la American Type Culture Collection (Manassass, VA) y se mantuvieron en DMEM con glucosa elevada que contenía suero bovino fetal al 10% y antibióticos. Las células se subcultivaron cada dos semanas hasta un máximo de 10-12 pases. Para los experimentos de diferenciación de osteoclastos, las células RAW se inocularon en placas de 96 pocillos a una densidad de 4×10^3 células/pocillo y se dejaron crecer durante 24 h. La diferenciación se indujo en DMEM con glucosa elevada, suero bovino fetal tratado con carbón vegetal al 10% (obtenido de Hyclone, Logan, UT), SAB al 0,05%, antibióticos, factor estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF) a 10 ng/ml y ligando de RANK a 100 ng/ml. Las placas se realimentaron el día 3 y los osteoclastos fueron claramente visibles al 4.º día. Típicamente, las células se tiñeron para TRAP el día 4 o 5 a menos que se indique de otra manera.

Para incorporar los casetes de expresión de shRNA en los cromosomas de las células RAW, se compró el plásmido pSilencer 2.0 (SEQ ID n.º 47) a Ambion (Austin, TX) y los oligonucleótidos específicos de la secuencia se ligaron como recomienda el fabricante. Se diseñaron dos plásmidos de expresión de shRNA y las secuencias 5'-GCGCCGCGGATCGTCAACA-3' (SEQ ID n.º 44) y 5'-ACACGTGCACGGCGGCCAA-3' (SEQ ID n.º 45) se utilizaron para atenuar la expresión génica del ortólogo de ratón de AB0326 (SEQ ID n.º 35). En estos experimentos se incluyó también como un control negativo un plásmido suministrado por Ambion que contiene una secuencia de shRNA mezclada sin ninguna homología con ningún gen de mamífero. Las células RAW se inocularon en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/pocillo y se transfectaron con 1 µg de cada plásmido utilizando Fugene6 (Roche, Laval, QC) como se describe en el protocolo. Después de la selección de los transfectantes estables en el medio que contiene puromicina a 2 µg/ml, las líneas celulares se expandieron y se les analizó la capacidad de osteoclastogénesis en presencia del ligando de RANK.

Las líneas celulares transfectadas de forma estable se designaron RAW-0326.1, RAW-0326.2 y RAW-ctl. Se inocularon 4000 células/pocillo en placas de 96 pocillos por triplicado y se trataron con el ligando de RANK a 100 ng/ml. Después de 4 días, los osteoclastos se tiñeron para ver la expresión de TRAP y se visualizaron con el microscopio óptico (aumentos de 40X y 100X, como se describe en los paneles izquierdo y derecho, respectivamente).

Los resultados representativos para la línea RAW-0326.2 se muestran en la figura 36. La línea celular RAW-0326.2 produjo significativamente menos osteoclastos (figura 36; panel inferior) que la línea celular que contenía el shRNA

aleatorizado (figura 36, panel superior). La línea celular RAW-0326.1 también mostró la atenuación del ortólogo de ratón de AB0326, pero no tan pronunciada (datos sin mostrar). Por lo tanto, al igual que se observó para las SEQ ID n.º 42 y 43, los siRNA para el ortólogo de ratón (SEQ ID n.º 44 y 45) (tabla 4) perturban el fenotipo de la diferenciación de los osteoclastos en el modelo de ratón también. Estos resultados, unidos a los obtenidos en las células precursoras de los osteoclastos humanos con el sistema de administración de shRNA mediante lentivirus (apartado J), demuestran que en los humanos y en el ratón se necesita claramente el producto génico de AB0326 para la osteoclastogénesis.

L.- Un ensayo de complementación funcional para la SEQ ID n.º 1 (AB0326) en las células RAW 264.6 para escrutar los inhibidores de la osteoclastogénesis

Para establecer un ensayo de escrutinio basado en la SEQ ID n.º 1 (AB0326) para encontrar moléculas pequeñas capaces de atenuar la diferenciación de los osteoclastos, el cDNA que codifica el AB0326 humano se introdujo en la línea celular RAW-0326.2. Así pues, si el AB0326 humano desempeña la misma función que el ortólogo de ratón en las células RAW 264.7, debe restaurar la capacidad de la osteoclastogénesis de la línea celular RAW-0326.2.

Para llevar a cabo esta tarea, la línea celular RAW-0326.2 se transfectó con un vector de expresión para eucariotas que codifica el cDNA de longitud completa del AB0326 humano, denominado pd2-hAB0326. Este vector de expresión (pd2; SEQ ID n.º 47) se modificó a partir de un vector comercial, el pd2-EGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA), en donde el gen de EGFP se reemplazó por la secuencia codificante completa del cDNA del AB0326 humano. La expresión del gen de AB0326 estaba impulsada desde un promotor fuerte del CMV. Se seleccionaron transfectantes estables para el antibiótico G418. Esto dio lugar a una línea celular RAW-0326.2 que expresaba el producto del gen de AB0326 humano en el cual se había silenciado el ortólogo de ratón de AB0326. Como control, las células RAW-0326.2 se transfectaron con el vector vacío pd2, que no debe complementar la actividad de shRNA de AB0326. De igual forma, el vector vacío pd2 se introdujo por transfección en las células RAW 264.7 para servir como un control adicional. Después de la selección de los conjuntos estables de células, se inocularon 4000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron durante 4 días con el ligando de RANK a 100 ng/ml. Tras la fijación con formaldehído, las células se tiñeron para TRAP, un gen marcador específico de los osteoclastos. Tal y como se muestra en la figura 37, las células RAW-0326.2 transfectadas con el vector vacío pd2 siguen siendo incapaces de formar osteoclastos en presencia del ligando de RANK (panel central), lo que indica que el shRNA del AB0326 de ratón sigue siendo capaz de silenciar la expresión del gen AB0326 en estas células. A la inversa, se rescatan las células transfectadas con AB0326 humano (pd2-hAB0326) y, por lo tanto, se diferencian en osteoclastos en respuesta al ligando de RANK (panel derecho). Las células RAW 264.7 que contienen el vector vacío (pd2) no vieron afectada adversamente la formación de osteoclastos en presencia del ligando de RANK (panel izquierdo). Estos resultados confirman que los ortólogos de ratón y de humano de AB0326 conservan su función en la diferenciación de los osteoclastos.

Este tipo concreto de ensayo con células puede servir ahora de base para escrutar compuestos capaces de fijarse e inhibir el funcionamiento del AB0326 humano. A esta línea celular «rescatada» se le podría aplicar una colección de compuestos para identificar moléculas (fármacos de molécula pequeña, péptidos o anticuerpos) capaces de inhibir a AB0326. Cualquier reducción de la diferenciación de los osteoclastos medida como una reducción de la expresión de TRAP sería indicativa de una disminución de la actividad del AB0326 humano. Este ensayo es aplicable a cualquier gen necesario para la diferenciación de los osteoclastos adecuada en las células RAW. Se puede desarrollar un ensayo de complementación para cualquier gen humano y utilizarlo como base para el escrutinio de fármacos.

Se están llevando a cabo experimentos similares a los descritos más arriba para otras secuencias (SEQ ID n.º 3 a SEQ ID n.º 33 o SEQ ID n.º 85 o SEQ ID n.º 86). Este tipo de ensayo puede utilizarse para escrutar las moléculas capaces de incrementar o disminuir (p. ej., inhibir) la actividad o expresión de la NSEQ o de la PSEQ.

En las NSEQ descritas en la presente memoria, sus procedimientos, composiciones, usos, sus ensayos o demás, el polinucleótido puede estar solo o en grupo (colectivamente), más particularmente puede ser (o puede comprender o consistir en) bien;

una porción traducible de SEQ ID n.º 1, de SEQ ID n.º 2, de SEQ ID n.º 3, de SEQ ID n.º 4, de SEQ ID n.º 5, de SEQ ID n.º 6, de SEQ ID n.º 7, de SEQ ID n.º 8, de SEQ ID n.º 9, de SEQ ID n.º 10, de SEQ ID n.º 11, de SEQ ID n.º 12, de SEQ ID n.º 13, de SEQ ID n.º 14, de SEQ ID n.º 15, de SEQ ID n.º 16, de SEQ ID n.º 17, de SEQ ID n.º 18, de SEQ ID n.º 19, de SEQ ID n.º 20, de SEQ ID n.º 21, de SEQ ID n.º 22, de SEQ ID n.º 23, de SEQ ID n.º 24, de SEQ ID n.º 25, de SEQ ID n.º 26, de SEQ ID n.º 27, de SEQ ID n.º 28, de SEQ ID n.º 29, de SEQ ID n.º 30, de SEQ ID n.º 31, de SEQ ID n.º 32, de SEQ ID n.º 33, de SEQ ID n.º 85 o de SEQ ID n.º 86;

secuencia sustancialmente idéntica a una porción traducible de SEQ ID n.º 1, de SEQ ID n.º 2, de SEQ ID n.º 3, de SEQ ID n.º 4, de SEQ ID n.º 5, de SEQ ID n.º 6, de SEQ ID n.º 7, de SEQ ID n.º 8, de SEQ ID n.º 9, de SEQ ID n.º 10, de SEQ ID n.º 11, de SEQ ID n.º 12, de SEQ ID n.º 13, de SEQ ID n.º 14, de SEQ ID n.º 15, de SEQ ID n.º 16, de SEQ ID n.º 17, de SEQ ID n.º 18, de SEQ ID n.º 19, de SEQ ID n.º 20, de SEQ ID n.º 21, de SEQ ID n.º 22, de SEQ ID n.º 23, de SEQ ID n.º 24, de SEQ ID n.º 25, de SEQ ID n.º 26, de SEQ ID n.º 27, de SEQ ID n.º 28, de SEQ ID n.º 29, de SEQ ID n.º 30, de SEQ ID n.º 31, de SEQ ID n.º 32, de SEQ ID n.º 33, de SEQ ID n.º 85 o de SEQ ID n.º 86;

una secuencia sustancialmente complementaria a una porción traducible de SEQ ID n.º 1, un fragmento de una porción que se puede transcribir de SEQ ID n.º 1, de SEQ ID n.º 2, de SEQ ID n.º 3, de SEQ ID n.º 4, de SEQ ID n.º 5, de SEQ ID n.º 6, de SEQ ID n.º 7, de SEQ ID n.º 8, de SEQ ID n.º 9, de SEQ ID n.º 10, de SEQ ID n.º 11, de SEQ ID n.º 12, de SEQ ID n.º 13, de SEQ ID n.º 14, de SEQ ID n.º 15, de SEQ ID n.º 16, de SEQ ID n.º 17, de SEQ ID n.º 18, de SEQ ID n.º 19, de SEQ ID n.º 20, de SEQ ID n.º 21, de SEQ ID n.º 22, de SEQ ID n.º 23, de SEQ ID n.º 24, de SEQ ID n.º 25, de SEQ ID n.º 26, de SEQ ID n.º 27, de SEQ ID n.º 28, de SEQ ID n.º 29, de SEQ ID n.º 30, de SEQ ID n.º 31, de SEQ ID n.º 32, de SEQ ID n.º 33, de SEQ ID n.º 85 o de SEQ ID n.º 86;

un fragmento de una secuencia sustancialmente idéntica a una porción traducible de SEQ ID n.º 1, de SEQ ID n.º 2, de SEQ ID n.º 3, de SEQ ID n.º 4, de SEQ ID n.º 5, de SEQ ID n.º 6, de SEQ ID n.º 7, de SEQ ID n.º 8, de SEQ ID n.º 9, de SEQ ID n.º 10, de SEQ ID n.º 11, de SEQ ID n.º 12, de SEQ ID n.º 13, de SEQ ID n.º 14, de SEQ ID n.º 15, de SEQ ID n.º 16, de SEQ ID n.º 17, de SEQ ID n.º 18, de SEQ ID n.º 19, de SEQ ID n.º 20, de SEQ ID n.º 21, de SEQ ID n.º 22, de SEQ ID n.º 23, de SEQ ID n.º 24, de SEQ ID n.º 25, de SEQ ID n.º 26, de SEQ ID n.º 27, de SEQ ID n.º 28, de SEQ ID n.º 29, de SEQ ID n.º 30, de SEQ ID n.º 31, de SEQ ID n.º 32, de SEQ ID n.º 33, de SEQ ID n.º 85 o de SEQ ID n.º 86;

un fragmento de una secuencia sustancialmente complementaria a una porción traducible de SEQ ID n.º 1, de SEQ ID n.º 2, de SEQ ID n.º 3, de SEQ ID n.º 4, de SEQ ID n.º 5, de SEQ ID n.º 6, de SEQ ID n.º 7, de SEQ ID n.º 8, de SEQ ID n.º 9, de SEQ ID n.º 10, de SEQ ID n.º 11, de SEQ ID n.º 12, de SEQ ID n.º 13, de SEQ ID n.º 14, de SEQ ID n.º 15, de SEQ ID n.º 16, de SEQ ID n.º 17, de SEQ ID n.º 18, de SEQ ID n.º 19, de SEQ ID n.º 20, de SEQ ID n.º 21, de SEQ ID n.º 22, de SEQ ID n.º 23, de SEQ ID n.º 24, de SEQ ID n.º 25, de SEQ ID n.º 26, de SEQ ID n.º 27, de SEQ ID n.º 28, de SEQ ID n.º 29, de SEQ ID n.º 30, de SEQ ID n.º 31, de SEQ ID n.º 32, de SEQ ID n.º 33, de SEQ ID n.º 85 o de SEQ ID n.º 86;

o una genoteca que comprende una cualquiera de las anteriores.

En las PSEQ descritas en la presente memoria, sus procedimientos, composiciones, usos, kits de ensayo u otros, el polipéptido puede estar solo o en grupo (colectivamente), más particularmente puede ser (o puede comprender o consistir en) bien;

SEQ ID n.º 48, SEQ ID n.º 49, SEQ ID n.º 50, SEQ ID n.º 51, SEQ ID n.º 52, SEQ ID n.º 53, SEQ ID n.º 54, SEQ ID n.º 55, SEQ ID n.º 56, SEQ ID n.º 57, SEQ ID n.º 58, SEQ ID n.º 59, SEQ ID n.º 60, SEQ ID n.º 61, SEQ ID n.º 62, SEQ ID n.º 63, SEQ ID n.º 64, SEQ ID n.º 65, SEQ ID n.º 66, SEQ ID n.º 67, SEQ ID n.º 68, SEQ ID n.º 69, SEQ ID n.º 70, SEQ ID n.º 71, SEQ ID n.º 72, SEQ ID n.º 73, SEQ ID n.º 74, SEQ ID n.º 75, SEQ ID n.º 76, SEQ ID n.º 77, SEQ ID n.º 78, SEQ ID n.º 79 o SEQ ID n.º 80;

un fragmento de SEQ ID n.º 48, SEQ ID n.º 49, SEQ ID n.º 50, SEQ ID n.º 51, SEQ ID n.º 52, SEQ ID n.º 53, SEQ ID n.º 54, SEQ ID n.º 55, SEQ ID n.º 56, SEQ ID n.º 57, SEQ ID n.º 58, SEQ ID n.º 59, SEQ ID n.º 60, SEQ ID n.º 61, SEQ ID n.º 62, SEQ ID n.º 63, SEQ ID n.º 64, SEQ ID n.º 65, SEQ ID n.º 66, SEQ ID n.º 67, SEQ ID n.º 68, SEQ ID n.º 69, SEQ ID n.º 70, SEQ ID n.º 71, SEQ ID n.º 72, SEQ ID n.º 73, SEQ ID n.º 74, SEQ ID n.º 75, SEQ ID n.º 76, SEQ ID n.º 77, SEQ ID n.º 78, SEQ ID n.º 79 o SEQ ID n.º 80;

o un análogo biológicamente activo, variante u ortólogo no humano de SEQ ID n.º 48, SEQ ID n.º 49, SEQ ID n.º 50, SEQ ID n.º 51, SEQ ID n.º 52, SEQ ID n.º 53, SEQ ID n.º 54, SEQ ID n.º 55, SEQ ID n.º 56, SEQ ID n.º 57, SEQ ID n.º 58, SEQ ID n.º 59, SEQ ID n.º 60, SEQ ID n.º 61, SEQ ID n.º 62, SEQ ID n.º 63, SEQ ID n.º 64, SEQ ID n.º 65, SEQ ID n.º 66, SEQ ID n.º 67, SEQ ID n.º 68, SEQ ID n.º 69, SEQ ID n.º 70, SEQ ID n.º 71, SEQ ID n.º 72, SEQ ID n.º 73, SEQ ID n.º 74, SEQ ID n.º 75, SEQ ID n.º 76, SEQ ID n.º 77, SEQ ID n.º 78, SEQ ID n.º 79 o SEQ ID n.º 80.

El experto en la técnica reconocerá fácilmente que los ortólogos para todos los mamíferos se pueden identificar y verificar con técnicas bien establecidas en la técnica, y que esta descripción no se limita de ningún modo a un mamífero. La terminología «mamífero(s)» para los propósitos de esta descripción se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, y animales en cautividad, para deporte o de compañía, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

Las secuencias de los experimentos explicados anteriormente son representativas de las NSEQ descritas en la presente memoria. La descripción de las funciones de las NSEQ en la osteoclastogénesis y el funcionamiento de los osteoclastos satisface una necesidad en la técnica para conocer mejor el proceso de remodelación ósea, y proporciona nuevas composiciones que son útiles para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento, prevención y evaluación de tratamientos para la remodelación ósea y los trastornos asociados.

El campo de la manipulación genética, de la biología molecular y del desarrollo de dianas farmacéuticas ha avanzado considerablemente en las últimas dos décadas. Resultará fácilmente evidente para los expertos en la técnica que las funciones recién identificadas para las secuencias genéticas y las correspondientes secuencias de proteínas permite que las secuencias, variantes y derivados, se utilicen directa o indirectamente en aplicaciones del mundo real para el desarrollo de herramientas de investigación, herramientas para diagnóstico, terapias y tratamientos para trastornos o estados patológicos en los que intervienen las secuencias genéticas.

Tabla 1: Secuencias expresadas diferencialmente que se han encontrado en los osteoclastos

Secuencia nucleotídica n.º	Número de unigén del NCBI / Símbolo del gen/ID del gen	Número de acceso	Posiciones nucleotídicas del ORF / secuencia polipeptídica n.º	Función
SEQ ID n.º 1	Hs.287692 / CD33L3 / 284266	NM_213602	150-1136 que codifican la SEQ ID n.º 48	Proteína hipotética LOC284266; asociada a la membrana, de función desconocida
SEQ ID n.º 2	Hs.520070 / C6orf82 / 51596	NM_001014433	104-700 que codifican la SEQ ID n.º 49	Marco abierto de lectura 82 en el cromosoma 6; asociada a la membrana, de función desconocida
SEQ ID n.º 3	Hs.546482 / LOC133308 / 133308	NM_178833	633-2246 que codifican la SEQ ID n.º 50	Proteína hipotética LOC133308 posiblemente implicada en la regulación del pH
SEQ ID n.º 4	Hs.135997 / LOC116211 / 116211	NM_138461	112-741 que codifican la SEQ ID n.º 51	Miembro 19 de la familia L6 de 4 regiones transmembranarias; función desconocida
SEQ ID n.º 5	Hs.558655 / LOC151194 / 151194	NM_145280	172-82 que codifican la SEQ ID n.º 52	Proteína hipotética LOC151194
SEQ ID n.º 6	Hs.89714 / CXCL5 / 6374	NM_002994	119-463 que codifican la SEQ ID n.º 53	Precursor del ligando 5 de quimiocinas (motivo C-X-C); actividad quimiocina
SEQ ID n.º 7	Hs.495960 / ATP6AP2 / 10159	NM_005765	103-1155 que codifican la SEQ ID n.º 54	ATPasa, transportadora de H ⁺ , proteína accesoria lisosómica 2; actividad receptora
SEQ ID n.º 8	Hs.42400 / USP12 / 219333	NM_182488	259-1371 que codifican la SEQ ID n.º 55	Proteína 1 de tipo proteasa 12 específica de ubiquitina; actividad endopeptidasa de tipo cisteína
SEQ ID n.º 9	Hs.164853 / UBE2E1 / 7324	NM_003341	175-756 que codifican la SEQ ID n.º 56	Isoforma 1 de la enzima E2E 1 de conjugación a la ubiquitina; actividad ligasa
SEQ ID n.º 10	Hs.433278 / EBPL / 84650	NM_032565	53-673 que codifican la SEQ ID n.º 57	Proteína relacionada con la fijación del emopamilo, Δ7-Δ8; integral membranaria
SEQ ID n.º 11	Hs.106015 / DDEF1 / 50807	NM_018482	29-3418 que codifican la SEQ ID n.º 58	Factor 1 potenciador de la diferenciación y del desarrollo; membranaria
SEQ ID n.º 12	Hs.517265 / SLAMF7 / 57823	NM_021181	16-1023 que codifican la SEQ ID n.º 59	Miembro 7 de la familia SLAM; actividad receptora
SEQ ID n.º 13	Hs.470804 / UBE2E3 /	NM_006357	385-1008 que codifican la	Enzima E2E 3 de conjugación a la

ES 2 397 441 T3

	10477		SEQ ID n.º 60	ubiquitina; actividad ligasa
SEQ ID n.º 14	Hs.278959 / GAL / 51083	NM_015973	177-548 que codifican la SEQ ID n.º 61	Preproteína galaina; actividad hormonal neuropeptídica
SEQ ID n.º 15	NM_032569 / N-PAC / 84656	NM_032569	19-1680 que codifican la SEQ ID n.º 62	Factor nuclear n-pac de tipo citocina; similar a la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa
SEQ ID n.º 16	Hs.248472 / ITGAX / 3687	NM_000887	68-3559 que codifican la SEQ ID n.º 63	Precursor de la integrina α X; adhesión a la matriz celular
SEQ ID n.º 17	Hs.156727 / ANKH / 1827	NM_054027	321-1799 que codifican la SEQ ID n.º 64	homólogo de la anquilosis progresiva; regulación de la mineralización ósea
SEQ ID n.º 18	Hs.477155 / ATP6V1A / 523	NM_001690	67-1920 que codifican la SEQ ID n.º 65	ATPasa, transportadora de H^+ , de 70 kDa, lisosómica, V1 subunidad A, isoforma 1; transporte de protones; actividad hidrolasa
SEQ ID n.º 19	Hs.445386 / FLJ10874 / 55248	NM_018252	139-1191 que codifican la SEQ ID n.º 66	Proteína hipotética LOC55248
SEQ ID n.º 20	Hs.467662 / ITGB1BP1 / 9270	NM_004763	170-772 que codifican la SEQ ID n.º 67	Proteína 1 asociada al dominio citoplásmico de las integrinas; adhesión celular
SEQ ID n.º 21	Hs.408236 / TXNL5 / 84817	NM_032731	77-448 que codifican la SEQ ID n.º 68	De tipo tiorredoxina 5; función desconocida
SEQ ID n.º 22	Hs.236516 / CLECSF9 / 26253	NM_014358	152-811 que codifican la SEQ ID n.º 69	miembro 9 de la superfamilia de lectinas de tipo C; integral membranaria
SEQ ID n.º 23	Hs.56294 / RAB33A / 9363	NM_004794	265-978 que codifican la SEQ ID n.º 70	Proteína Rab-33A relacionada con Ras; transducción de señales mediada por GTPasa pequeña
SEQ ID n.º 24	Hs.282326 / DSCR1 / 1827	NM_004414	73-831 que codifican la SEQ ID n.º 71	Isoforma a de la calcipresina 1; interacciona con la calcineurina A e inhibe las vías de señalización dependientes de la calcineurina
SEQ ID n.º 25	Hs.520794 / YKT6 / 10652	NM_006555	158-754 que codifican la SEQ ID n.º 72	Proteína Ykt6 de SNARE; transporte vesicular entre los compartimentos de secreción
SEQ ID n.º 26	Hs.509765 / ACTN1 / 87	NM_001102	184-2862 que codifican la SEQ ID n.º 73	Actinina α 1; constituyente estructural del citoesqueleto; fijación de iones de calcio
SEQ ID n.º 27	Hs.113823 / CLPX / 10845	NM_006660	73-1974 que codifican la SEQ ID n.º 74	Homólogo de la proteasa X casinolítica ClpX; regulador de la proteólisis dependiente de energía

ES 2 397 441 T3

SEQ ID n.º 28	Hs.155097 / CA2 / 760	NM_000067	66-848 que codifican la SEQ ID n.º 75	Anhidrasa carbónica II; actividad carbonato deshidratasa
SEQ ID n.º 29	Hs.520714 / SNX10 / 29887	NM_013322	216-821 que codifican la SEQ ID n.º 76	Nexina 10 clasificadora; función desconocida
SEQ ID n.º 30	Hs.525061 / TDRD3 / 81550	NM_030794	258-2213 que codifican la SEQ ID n.º 77	Contiene 3 dominios Tudor; fijación a ácidos nucleicos
SEQ ID n.º 31	Hs.275775 / SEPP1 / 614	NM_005410	101-1246 que codifican la SEQ ID n.º 78	Selenoproteína P; espacio extracelular, interviene en la defensa
SEQ ID n.º 32	Hs.518138 / KIAA0040 / 9674	NM_014656	921-1382 que codifican la SEQ ID n.º 79	KIAA0040; proteína nueva
SEQ ID n.º 33	Hs.368912 / DPP4 / 1803	NM_001935	562-2862 que codifican la SEQ ID n.º 80	Dipeptidilpeptidasa IV; actividad aminopeptidasa
SEQ ID n.º 34	Hs.304682 / CST3 / 1471	NM_000099	76-516 que codifican la SEQ ID n.º 81	Actividad inhibidora de las cisteína proteasas
SEQ ID n.º 85	Ninguna / ninguna / ninguna	AL357873	Nueva	Nueva
SEQ ID n.º 86		AL645465 / BQ182670	Nueva	Nueva

Tabla 2: Se muestra la secuencia consenso de SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2 clonadas a partir de una muestra de osteoclastos humanos maduros

Identificación de la secuencia	Posiciones nucleotídicas del ORF	Secuencia polipeptídica n.º
SEQ ID n.º 83	1-987	SEQ ID n.º 48
SEQ ID n.º 84	1-471	SEQ ID n.º 49

5 Tabla 3: Lista de ortólogos de ratón para AB0326

Identificación de la secuencia	Unigén/cluster del NCBI	Número de acceso	Posiciones nucleotídicas del ORF	Secuencia polipeptídica n.º
SEQ ID n.º 35	Ninguno / LOC620235 / 620235	XM_884636	122-1102 / similar a la molécula 2 de adhesión de las células neurales / función desconocida	SEQ ID n.º 82

Tabla 4: Lista de otras secuencias de identificación de plásmidos y oligonucleótidos de shRNA

Identificación de la secuencia	Nombre	Descripción
SEQ ID n.º 36	p14	Vector para STAR
SEQ ID n.º 37	p17+	Vector para STAR
SEQ ID n.º 38	pCATRMAN	Vector para STAR
SEQ ID n.º 39	p20	Vector para STAR
SEQ ID n.º 40	OGS 77	Cebador utilizado para el vector p14 para STAR
SEQ ID n.º 41	OGS 302	Cebador utilizado para el vector p17+ para STAR
SEQ ID n.º 42	Humano 0326.1	Secuencia de siRNA para SEQ ID n.º 1
SEQ ID n.º 43	Humano 0369.1	Secuencia de shRNA para SEQ ID n.º 2
SEQ ID n.º 44	Ratón 0326.1	Secuencia de shRNA para SEQ ID n.º 35
SEQ ID n.º 45	Ratón 0326.2	Secuencia de shRNA para SEQ ID n.º 35
SEQ ID n.º 46		Vector pSilencer 2.0
SEQ ID n.º 47		Vector pd2

Tabla 5:

Tabla 5 -

Secuencia de Nucleótido (5' - 3')	ORF#
<p>SEQIDNO. : 1</p> <p>TTCTGGTCCCGCAGAGCCACAGGGACCTGCAGATCTGAGTGCCTGCTGCCACCCCGCCGCTTCTTCCGCCACACGCTGGGA GGCCCTCACTGGGGAGTGGCCGAGAACGGGTCTGGCCCTGGGGTTCAGATGCTCAAGCATGGAAAGTCCATCTGGCTGCTGG CTTGTGGGTGGTTCTCCGACAGGCTCATTTGTGAGAACTAAATAGATCTACGGAACTTGCTCAACACGAGGTGCACA GCTGCCAGCCGCGGCTGCTCATGCRGTGCCACCCGAGTGAAGCGCGAGGCCAGGCCACGGCCAGTGTCCCTGCACCTTCA CGCACCCACACGCCCACCTACACGGCCGCTGACCGCCATCTGGCGCGCGGGGAGCCCTATGGGGCCCGCAGGTGTTCCGCTGG CTCGCGCGGGCACCGAGCTTGCACGACGGGCTGAGCTTGCAAGCCGCTTCGCTGCTGGGCAACCCCGCCGCAACCGACC TCTCGCTGGGTGGAGCGCTGGCCCTGTGACAGACCGCCGCTACTTTCGCGGTCGAGTTCGCGGCGAGCTCCATGACCGCT ACGAGACCCGACCGGCTCCGGCTGACGAGACCGCGCGGATGCTCAACATCTGGTCTGCTGCCAGTCCGCTCACGCT TCGGCGCTCTGCACCTCCGAGGGGAGCCCGCCGCTTCCGCTGGTCCGCCCGGCTGGGCAACAGCTTGGCAGCCGCTGC GGAGCCCGGTGAGGCTCAGGGCACCTGATGACCGCGAATGCGCCGCACTGACCCATGACCGCGCTACRGTGTACGGCCGCCA ACAGCCTGGGCGCTCCGAGCCAGGCTTACTGTTCGCTTCCATGGCCCCAGCGGCTCCGCGCCCGAGCATCTGGACACCCCGGAC CTCTGGCTTCAAGGCTGTCTGCTGGGTCTGGGCTGGCCCGCCGCTGCCCGCCAGATGAACCCCGGAGCCACACGACCACATGTCTCAC CCCCACAGGTTCCAGGCCCAGGATCCUANTATGAAATTTAGCCAGATGAACCCCGGAGCCCTGCGTGGCCACACAGCCAGTCCCT CGTAGGAGTCCCTCAGCCACCAACTCCATTCAGACINTAAGAACAGCCAGTCCGAGGCTGCGTGGCCACAGCCAGTCCCT GCTTCTGGGCACTTGGCAGCCCGCCGCTGGTGGCTTCCCTCCCTGCTCAGGCTCAGACCCCTGCTDAAGGAGGCTCATCTGGCT CCTATGTGGACAAACCATTCGGAGCTCCCTGATATTTTGGCCAGCAATTCGTAATGTGCATACGCTCTGGTGTGTGTGTGTGTGT AGAGAGGAGAGAGAGATACACGGCAATTAGCTTAGCGTGAAACTTCCAGAAATGTTCCCTTCCCTTCTTACTAGAACACCTGC TATGTAAGCGACAGGAAACTGTAAAAAANAANAANAANA</p>	<p>SEQIDNO. : 48</p> <p>NEKSIWLLACLAWVLPFGSFVET KIDTTENLLNTEVHSSPAQRWSM QVPPVSAEAGDAAVLCTFTHP HREYDGPLTAIWRAGEPYAGPOV FRCAARGGSELCTALSLHGRFR LLGNPRNDLSLVERLALADDR RYFCRVEFAGDVDRVYERHGV LHVTAARIVNISVLPFAHFR ALCTABGFPPALAWSGPALGNS LAAVRSFREGHLVTHLPAIT HDGRYTCTAANSLGRSERSVYLF RFNAGSASTVALLGLGLFRAL LLLGLAARARRRRRPHLDTDT PFRSQAQESNYENLSQHNFRSFP ATWCSP</p>

SEQIDNO. : 2	ACGGAACGGGGCCATTCCGGGCACGCTCCAGATGGGTAGTCGATTGCTCAGTCCCATGGCTCCTCCTTCATCAGGAG GTGGCAACCGCCCATGATAGGGTCGGATGGCTGGCTCTGAGCGCCAGGTGGTCTCTTACTTACTCTCATGTGCGGCT GTTTCTAATCAGTGGCTCCACCCAGCCCTCTCGCTCTGCTTGTGGTGGTGGGCGGCTGCTGCTGCTGCGCTCCCGCT TTTGTGCTACCCGGATCTTGTGACCATGGCCCTGGAAGCCCTCCGACCCAGCCCTGCGGCTCGGATTCCGGCTCTGGCTA CGTTCGGGCTCGGTCTTGCACTTGTACTTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT CCTAGAGCCTGGTCAACTCATCCCTCAGATTACATCAATGAGTGGAAAGGAGATCGAGGAGACAGTGGGCTGCTGAT GATGATTAAACCCAAAGTTCCCTGGTCCAGCTTGACAGATTTTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT ATTGCTGTGGAACAGGGAACTTCCGTACCTGAGTGGTGCAGGTCACAGTCTGTTCTGACTCTATCACAGTCTTCCGCT ATGATGAGCCCTGTTCTGCTCATCATGAGATCCCGCGGATCTTCAACGCTTCTGACTTCCAGGTGATGACTGGGCCCCCAATA AATCCGCTCTTGGGTCCTCTGCCCCAAAAAAAAA
SEQIDNO. : 49	MIGSGLAGSGGAGGPPSTVTWCA LFSNRVAATQASLLLSFVWMPAL LPVASRLLLLFRVLLTWSGSPF TQSPASDSGSGYVPGSVSAAFV TCPNEKVAKEIARAVVEKRLAAC VNLIPO.TTSIYEWKGIKIEEDSEV LMMIKTQSSLVPAITDFVRSVHP YEVAEVIATLPEQCENFPYLQWVR QVTEVSVSDSIITVLP

SEQIDNO.:50

MEDEDKRIYEDSEFSTGMNTPT
 SMHQRAQDESTMVNLKGLDAMEPT
 ESSLKSSSEKQLQETPTBAHV
 QRPRMLACPPHBLDRVIYNTV
 IIVLLWAVTMSITGSECLPQGNL
 FGIILFYCAIIGGLLGLKLP
 TLPPPLSLGMLLAGFLIRNTPV
 INDMVQIRKHWSSSLRSLALSII
 LVRAGLGLDSKALKKLGVCVRL
 SMGFCIVEACTSALLAHLLGLP
 WQMGFIFLGFVLGAVSPAVVPSM
 LLLQGGYGVKGVPTLLMAGS
 FDDILAITGNTCLGIAFSTGST
 VENVLRGVLEVVIGVATGSVLGF
 FIQYFFSRDQDLVCKRFFLVLG
 LSVLAVFSSVHFQFSGGLCTL
 VNAFLAGWMTSEKAEVEKLIAR
 AMDIFQFLFLGLIGAEVSIASLR
 PETVGLCVATVGVIAVLRILITF
 LNVCFAGFNLKEKFLISEMFLPK
 ATVQRAIGSVALDTPARSHGEKQL
 EDYGMVLVTVAFSLILITAPLGS
 LLILGLLGFULLQKVEHQMKDBEV
 QGETSVQV

SEQIDNO.:3

CGGTGTCGTCATCTCGGGAGACTCGGCGCTGGGTCGCGCTCTGSGTAAGCTTTCGGGAGCTTTCGGGAGCTTCGCT
 GGTCTCGCCGAGAGCCTCGGACCCGCCCCAGGAGGATRAGCAGTGAAGACCGCGGTCGCGGTCCGCGAGCCGCCGCGGACGT
 GGGCCCAFGTGGCTGGCGCCACTTTCGGGGGAGCCAGCGGACCCGACCGGACCGGACCGGCTTTCGCAACCAGCCGCGC
 CTGAACCCGGGGAGGCACAGGGGCTGCGGCTGGGCCCCGGGACCAACCCTACTTACTCGGAGCCTGTGACCGGCTGAGACCGGT
 GFTGGACTCCCTGCGCGGTGCGCCAGCGGCTCGTGGGAAGGCGGGCTGACTACACGGGGTGGGGCCGCGGCTGAGACCGGCTCGG
 ATCTGCAGTCAAGCGCTCCGGCTCAGCTGGGAGATGCGGATCGGAGACCTGCGGAGACTGCCAGATCGGCTCTTCCCTGCTG
 CGCTCCCCACAGCCCTTTCCTAATCGTTCAGACGAGCTGGTGGACTACATATGAGATTCAGAACCCATCCACAGGAMGAAATYACA
 TGTCTACTCTTAAATPAATATGGGGATGAGATRAAGATTAAGCTCAAGGTATAGATGCARATGACCAACAGAGAGAGATYACA
 CGCCCTCCATGCAATCAGAGCACAGGAGGAGACTTATGAACTCAAGGTATAGATGCARATGACCAACAGAGAGAGATYACA
 TTTTGAAGAGCAGTGAAPAAAGCTACAGAAACACCACTGAGACCAATCAGGTACAAAGACTGAGCARRATGCTGGCTGCCCCC
 CACATGGTTACTGGACAGGFTCALACAAAGTTACCAATGTTCCTGTTGGGCTGAGTGGTGCATTTGGTGTAACTTTGGGGCTTATTAAGTTAC
 GTTCTCCGAGGAAACCTATTTGGRAATTATAATCTTATTTRITGGCCACTTTCAGGTTCTCATCAGAAATCCCGACTCATCAAGATYACG
 CTACATGGCTCCACTGCTTTCCTTTGGCATGCTGCTGCGAGGTTTCTCATCAGAAATCCCGACTCATCAAGATYACG
 AGATCAAGCACAGTGGTCTTCTTTGAGAASCTAGCCTGICTATCAATTCGTTGGTGGGCTGCACATCTGCTCTCTTGCCCCAAT
 CCTGAGAGACTAAAGGCGTGTGTAAGACTGTCATGGTCCCTGATTTGGTGGCTGATCTCCAGCTTTGGGTGGCTTCAATGC
 ACCGTGGGTTTACCNTGGCAATGGGATTAATCTGGGTTTGGTGGCTGATCTCCAGCTTTGCTCATGCAATCTGATGGGCTTCAATGC
 TCCTTTGAGGAGGAGCTATGGTGTGAGAGGGTGTCCACCTTGTCTCCACGAGCTGGCAGCTTCGATGCACATCTCGGCCA
 TCACTGGCTCAACACATGCTTGGGCTAGCCCTTTCACGAGCTTACTGCTTTAATGTCCACAGGAGGTTTGGAGGTGTAA
 TTGGTGGGCACTGGATCTGTTGGATTTTCATTCATGACTTTCACAGCTGGGCTGACTGTTGGTGGGCTTGGTGGGCTGAGACACT
 TCCTTGTGTTGGGTTGCTGTGCTAGCTGTTCAGCAGTGTGCAATTTGGTTCCTCGGATCAGGAGGACTGTCACGCTGTTGCA
 TGGCTTTCCTTGAGGCAATGGGATGGACCGGAAAGCCAGGTTGAAGAATAATTCAGTGGCTCCGAGCAATTTTTCAGCCCC
 TCTTTTTGGACTAATGGAGCAGGATCTATGGCACTCTCAGACAGAAACTGTAGGCCCTTGTGTGCTCCAGCCAGTGGCAJTG
 CAGTATTGATCGAATTTGACTTACTTICTGATGGTGTGTTGCTGGTTTAACTAABAGAAAGATTTTATTTCTTTCAT
 GGCTTCCAAAGGCCACRGTTGCGCTGCAATAGGATCTGCGCTTGGACACAGCAAGCTCACATGGAGAGAAACATYTAGGACT
 ATGCAATGATGTTGACAGTGGCATTTTGTCCATCCICATCAGCCCCCAATGGAACTGCTTATTTGTTACTGCGCCCCA
 GGCTTCTGCAAGATGAACTCAAAATPAAGATGAAGAGTTCAAGGAGACTTCTGTGCAAGTTAGAGGTTGAAGAAAGAGAG
 TGCTGACATATGTTTGAAGAGCTACTTTTTCAGATGCATATGAATGTAAATGTTTAGCTTAAATGTTAATAGAAC
 ABAAGTGTAGCTGTTCTTTAAACAGCAATTTTAGCCCTTGTCTTTTCCATGTTGGGTGCTAATGATTCATATATCCCAAAA
 AAAAAAAAAA

<p>SEQIDNO : 4</p> <p>GACAACTTCAGGTCAGCCCTGGAGCTGGAGGTGGAGCCCCACCTCTGAGAGCGCAGCCTTTCTCCAGGTTCTGTCCTCCCATTTCTGATTTTGACACACAGATGCGAGTGTCTCTCCCTGCACGCGCGCAAGCTCACGGACTTGTCCCGTATCCCTGGACTGAGCCTTGGACTGACGCCCTGTTTCTCTCTGGGCCCACCTGGCCACTCTCCCTTCTTAACCTGGATGTCCACCTACTGTTGAGGGCCCTCCTTGGCAGGCATGCCCCTGCTGGAACTGGCTCTGGGAGAGCCCTCATGGTACTACTGCACTTCCCTCATCTCTTGTATGGGCTGGAGATAGGGCTGCTTCAGTAAGATGGGCTCTGTGGAAGCTGTTACTGCTGTTGTCAAGTGGCTGGCTTTACTTGGAGCCCTGATTTCTCTCACTTCTGGAGTGGCTCTGAAAGATGGTCTTTTGGCATGTTTGAATGTTTCATCCCTTCRAATCAGACACAGCTTGGAATATGGTTACCCATTCAAAGACCTGCATAGTAGGAATATCTGTATGACCGTGGCTTGGAACTCCGTCCTGGAGCCCCTGTGCAGCTGTTGTCTGGCACGGTCCCTCTCTCCGCCCCTCTGTGCATCAGCCCTGCTCCACTTCTCTGGTCTGTTGATGTCATCAACAGCCCTCTGGCCCTTTCTGCAGCCTCTGGGAGAGTGAAGCCAGAACCTTCACTTGCRAAGCATGGTGTGTTGATCATGCGCTGCTGATCCCTTTCTACRAGGAGTGGGTTTCAGGCCCTCTGTGTTAAGACTGTATCCATGCTGCTCAAGGAGGAACCTGGCAAATGCTGAATATCTCCAGAGAAATGCTCAGCTTACAAAACATTTATCAGAAAACATTTAAAGATAATTTAAAGGTATATCATGCTGAAAAPAAAAAAA</p>	<p>SEQIDNO : 51</p> <p>MVSSPCTPASSRTCSRILGLSLG TAALPAAGANVALLLENWDVTVL LRGLLRHMLGTGLWGGGLMVL TAAILISLMGWRYGCFKSLGCR SVLTAALLSGGLALLGALYCFVTS GVALKDGPFCMFDVSSFNQIQAN KTYGPPFDLHNRNYLYDRSLWNS VCLPSSAAVWHVSLDPSALLCIS LLQLLLVVVHVIVINSLLGLFCSLC EK</p>
---	--

SEQIDNO.: 52

MAIVPYEETTEFGQKFKPLAT
PSFANKHYIQIRDWRHLGVAAV
WDAAI VLSYTYLEMGAVELRGRSA
VELGAGTGLVGIYAALLGAHVTI
TDRKVALEFLKSNVQANLPHIQ
TKTVVKELTWGNLGSFSPEEFD
LILGADIIYLEETFDLLQTLKH
LCSNHSVILLACKRIRYERDNNFL
AWLEROFIVRKVHYDPEKDVHIY
EAQRNOKEDL

SEQIDNO.: 5

CCACGCGTCCGGCACTCCAGGGTCCGGGAGACGGAACTCGGGCACCAGTAATTCGGTTTCAAAACCCTAACACCCCGCTAA
GGCAGGTTCTGTCCATTTGTTACACTGCAAGCAGCCGATGGAGAGGGAGGCTGAGCAGAGGGGGGGTGCAGGGCGGAATG
GCCCTCGTCCCTATGAGGAGACCACGGAAATTTGGGTTCCAGAAATCCACAAGCCTCTTCCAACTTTTCCCTTTGCCAAACCCACACG
ATCCAGATCCGGCAGGACTGGAGACACCTGGGAGTCCAGCCGCTGGTGGATGGCCATCGTTCTTCCACATACCTGGAGATG
GGAGCTGTGGAGCTCGGGCCCGCTCTGCCGTGGAGCTGGTCTGGCACGGGGCTGGTGGCCATAGTGGCTGCCCTCATCCAACTAAA
CATGTACTATCAGGATCGAAAGTAGCATAGAAATTTTAAATCAAAACGTTCAAGCCACCTACCTCTCATATCCAACTAAA
ACTGTTTAAAGGACTGACTTGGGACAAATTTGGGGAGTTTTCCTCTGGAAATTTGACCTGATCTTGGTCTGATATCATA
TATTTAGAAAGAAACATTCACAGTCTCTTCAAAACACTGGAACTCCTCTGCAATCTCTGATCACTCTGATCTTTCAGCAYGCCAAAT
CGCTAYGAAACGGGATPACAACTTCTTAGCAATGCTGGAGAGCAATTTATTTGAGAAAGGTTCACTACGATCCGAAAGATGTA
CATATTTAGGAGCACAGAGAGAACCCAGAGGGAGCACTTAPATTTGGCTAATATTAAGAAATGTTGATCATTTGAGTGTCTCCT
TAAGGCTTAGACTGCAATCTAACATATTAATGAAATGCTTACTGTACAAAAGTCTAAGCCAAAGGTTCTCAGGGGAGAAAG
CACATGTGAGTTTAAACAAGCAGTCTTTGTCCTTGTGANTTTTGTAGTCCAGCTTTACTCAGTCTGAAATGCAATTAAC
ATTAAAGGATTAAGTGTAGATTTCCGATTTATGCTATTTGGTATCCCACTCTCCCTTTAATAAACAGTCTTCCACTGATGTA
TGAAGGGCCGGTAAAGAGTCTTAAATGAGTAGCTTTCTGTGTAAGATTAATCTTCAAAATTTTTTAAACCTTGTGATA
TATACATGTTAGCTGAGTCTTAAATTTCTGGATSTAAACAAAGGTTTAACTTCACTTCCCTGAGCTGTTAGTGTATTT
AAATCTTTGCCCCTTGGTCTTAACACTTTTGTAGTAGGATGAGCTTTTTGGGTCTCATATCATGCTTTTTTCCCTTA
ATTTCAGGATATATATATAGTAAAGGAAATTAAGTAAATTAATTTCCAGTTACTTTTTAAAGCACTGAAATCTGGCCGGA
TGGGTTGCTCATGCCCTGTAAATCCACCCCTTTGGAGGCCGAGGCGGAGATCACCTGGGCTGGGAGTTCAAGACCGCTGGC
CAACATGGTGAACCCCTCTACTAATAAATACAAAATTAGCCGGGGTGTGGGCGCCCTGATCCCTGAGTGTCTGGGACAGGA
CTGAGCCAGGGAACTCGTTGAACCTGGGAGCCGGAGGTTGCAAGTGGCCATTTGTACTCCAGCCCTGGGGGACAGGA
GGGAGACTCCATCTCAAAAATAAAAAA

SEQ IDNO. : 53

MSLLSSRAAEVPPGPSLSLCAALV
LLLLLTQPGPIASAGPAAAVLRE
LRCVCLQTTQGVHPKMSLNLQVF
AIGPQCSKVEVVASLKNKGEICL
DPEAPFLKRVTKILDGNGKEN

<SEQ IDNO. : 6

GTGAGAAAGCCGAGGAACCCAGTGTCCGGATCCCTCCAAATCTTGGCTCCTCARTCCGGTCTCCACCCAGTTCAGGAACC
GGCAACCGTCCGACCGCTCTTGAACCACATYAGCCTCTCTGTCCACCGCGCGCCGTTCCCGGTCCTTCGAGCTCCCTTGTG
CGCCTGTGTGTGCTGTCTGTGACCGCAGCCAGGCGCATGCGCAGCGCTGTGCTCCGCTGCTGTGTGTGAGAGCTGCG
TTGCCGTTGTGTACAGCCACCGCAGGAGTTCATCCCAAAATGATCAGTAATGTCNAGTGTTCGCCATAGGCCACAGTGTCCRA
GGTSGAAGTGTAGCCCTCCCTGAAGACGGGAGGAATTTGATCTGATCCAGAACCCCTTTCTAAAGAAAGTCAATCCAGAAAT
TTGGACCGGTGGAACRAGGAAACTGATTAAGAAATGACACCGCATGGAAAGTTCCTCAGTCGAGGAAATTTCTCTGGA
AGGTCTGBAACCCAGGGAGACAGAGAGGAAGATTTGTGTGTTGTTTAAATTTGTTTTCCAGTAGTGTGTTCTTCTCTGGA
TYCTCACITTAGAGAGTGTGAGGAAACCTATGTTGGCGTTAAGTTTTCACTCAGCTAATGAAAGTGTTAGCATAGTACTCI
GCTATTGTCTGTATTTATCTGTGTATGCTATATATTTCCAGAATAATTCCTTAAGTATTAACAGAGCTGTGSAATTAATGTT
TCRAAGTGTGTGATTTGAGTACTATATATTTCCAGAAATTTCCCTTAAGTATTAACAGAGCTGTGSAATTAATGTTCTT
GAATGATTTTTCATAGAAATCTGTGTGTAAGTAATCTGTTACTTTTAAGAAATAGGAAATATTTAATGTTCTT
GGGRATATGTTAGRAATTTCTTACTTATCAGAAATTTCTAARAGTTTAGTTCTTAGGGCTTAAATCTTCTCTATAATTTTGA
ATCTATGAGAAATATTTCTTATTTAGTAGGGCAACTGCCATCAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTA
CAITCTTTATCTTTTAGTAGGGCAACTGCCATCAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTA
AGTACCRPAAITCTGGTAGTAAATATAEATTTAGATAGATGAGAGCTAGAAACAGGCAATTTCTGAAAGTTTGGAAACGTTTCRAACAAATTT
GAAATGATTTCTTGTAGTTTAAAGTAAAGCCAAACTTAAATGAGCCTTACTCGAGCCCTAGCAATTTCTCTGGATAGGGACCCAGAGA
GAATATAAATTTATCATTTAGTTATAAATATAATGAGCACAATCCAGGAGAGTGTCCAAAGGATGTCATTTTATCCCTCTGTATGGT
GCTTGGAAAGTTAAAACAARAACAARA
TAGATTTCCAAARATCATATTTGAGAGGCCAGCAATTTATGGTGAATATAAATATAAATATAAAGGTGGCCACGCTGTTCTAGTCC
TCCCTCCCACACTCAGCTTGGCCCTTTCACAGATAGAACCTGGSTTAGGATTCAGAACATTTCTGTAATGTAAGCCCTGTTCTAGTCC
GGGAAATGCTGTGGGTTTTAGCCRCGTTCAITTCATGSGAATTTGAAGCTTCTGTAATGTAAGCCCTGTTCTAGTCC
TGGTGGGACACACTGGGTTTTGGGTTGGGGAAGTCCGTTANTGAACCGGTAGTCTAGTGTGCTTAAATGTAAGCCCTGTTCTAGTCC
GTAAGTTTATTTTACAAATATTCTGTTPAAGTATTTCACTTTTGTGAAATCCCTCCCTTTAAGAGAAATTAATGTTGTAATTTCT
TGTGAAAGGCTTGTAGGAAAGCTCCCTTTTCTTTTAAACCTTTAANGACAAACCTAGGTAATTAATGTTGTAATTTCT
ATTTTGTCTTTGTATTATGAACATTTGCTTTCAGATAGGATTTCTGTGTAAACCTTTAANGACAAACCTAGGTAATTAATGTTGTAATTTCT
TGCRAATACBAAGCTACTGCAGAAATAATAAACAATTTCTGGTAAACCTTTAATATAATATAATATAATATAATATAATATAATATA
ATATATAATATAATAGCCTTTTAGATGCGCTTTTAGAGGTTTTAANGGTTTTGACCCTTTTGTGTAAGTATAATATAATATA
TATATAATATAATATAAATGACTTTTTTACTATGTCATGTTGTTCAATGTTTCTTATTTGTCTTTGAAATATAC
ATTAAGAAATTTCTAATCTTCAAAAAAATAAAAAA

SEQIDNO.: 54

MAVFVLLALVAGVLGNFESILK
 SPGSVFRNGNWPPIFGERIPDVA
 ALSMGFSVKEDLSWFGLAVENTP
 HRPRATVMVVKGVNKLALPPGS
 VLSYPLENAVFFSLDSVANSIHS
 LFSEETPVVLQLAPSEERVYMG
 KANSVFEDLSVTLRQLRNLFOE
 NSVLSLPLNLSLRNNEVDLFL
 SELOVLDHDISSLLSRHKHLAKDH
 SPDLYSLELAGLDEIGKRYGDS
 EOPFRDASKLILVDALQKFPDDMYS
 LYGGNAVVELVTVKSFDTSLRK
 TRTILEAKQAKNEARSPYMLAYKY
 NFEYSVVFNMVLMIMIALALAVI
 ITSYNLWMMDFGVDLSIIYKWTNQ
 KIRMD

SEQIDNO.: 7

CTGGACGAGTCCGAGGCFACCTCCTCACCGCTGGGCTGTGCGCCGCTCCCGCCGCGCTCCGCTGTCGCCCCCGCAGTCTGTC
 GCGCCGCGGACCAATGGCTGTGTTGTGCTGCTCCGGCGTGGTGGGGGGTGTGTTGGGGAACGAGTTFAGTATAATTAARATCA
 CCAGGTCTGTGTTCCGAATGGAAATGGCCATPACACAGAGGGGATCCCEAGCTGGCTGCATTTCCATGGGCTTCTCT
 GTGAAGAAGACTTCTTGGCCAGACTCCGAGTGGTACCTGTTTCATCGTCCCGGCTACCGCTCATGGTGTGATGGTGAAGGGA
 GTGAACAACCTGGCTTACCCAGGACGTCATTTGGTACCCTTTGGAGATGACAGTCCCTTTAGTCTTGACDAGTGTGCAAAAT
 TCCATTCACTCCTTAAFTTCTGAGGARACTCCTGTTGTTTGGCAGTTGGCTCCAGTGGAGAAAGAGTGTATATGTTAGGGAAGCA
 AACTCAGTGTGGAAGACCTTTCAGTCACTTGGCCAGCTCCGTAAPCGCCCTGTTCAAGAARACTCTGTCTCAGTTCACCTCCC
 CTCRAATCTCTGAGTAGGAACAATGAGTTCAGCTCTTCTTCTGACCTGACAGTGTACATGATATTTCAAGCTTGTCTCT
 CGTCAATAGCMTAGCCAGGATCATCTCCTGATTAATATTCACCTGAGCTGGCAGCTTGGATGAAATTTGGGAAGCCTTATGGG
 GAAGACTGAAACAATCAGAGATGCTTCTPAGATCCTTGTGACGCTCTGCAAAAGTTGCAAGTGCATGTACAGTCTTTATGGT
 GGGAAATGCAGTGTAGTTCAGTCACTGTCAGTCAATTTGACCTCCCTCTATAGGAGACAGGACTATCCTTGGAGGCAAAACAA
 GCGAAGAACCCGCAAGTCCCTATAACCTTGCATAAAGTATAATTTGAATATTCGTTGTTTCAACATGCTACTTTGATTAATG
 ATCGCTTGGCTTGGCTGTGATTAACCTCTTACAAATTTGGAAATGACCTGAAAGAAATGTAARCAATTAGAATGCTCGTGTATGGAAA
 ARCCGAAGATCGAATGGAATGAAATGTTACTGTGCCAGAAATAGAAAGGGGCTTGGAAATGGCTTTTGTTRAAATATATCT
 TTTTAGTGTCTTTAAGTAGATAGTAACTTTACATTTAFAAAAAAATCAAAATTTGTTCTTTAATTTGGTGTGCTGTGATCT
 ATAACTTGAATTTCACTTCTTAAATGAAATTTGGAAATATGCACTGAAAGAAATGTAARCAATTAGAATGCTCGTGTATGGAAA
 AAGTGCATGAAATTTAGACAAACTTACGAAATGCTTAACTTTTACACAGCATPAGGTGAAATCAATTTGGGCTATTTGATA
 CTATGAACAATTTGTRAAATGCTTAAATTTGATGATATAACTCTGAAACACAGAAAGGTTTTPACTTTRAGTAGCCCTAABAATA
 TGGATGTGCTTATAAATCGCTTAGTTTTGAACTGTATCTGAGTAAACAGAGGACGCTGTTTTTAAACCTCTTCTGCAAGTGTG
 TGACCTACATGGCTAATATGGATCTAABAATACTACTGATTTGATCTPAGAAAPACTAGCCCTTGTGGAGTATATAGATGCTTTTCAT
 TATACACACAATAATCCCTGAGGACATTTTGGCCATGAAATATAAACACTTTTTATTTCAAGTAACTTTTCCCCCTGTGTAAGTTAC
 TATGTTTGTGTACACTTCAATTTATAGAAATTAAGTGGAAATGCTACTTTTTATTTGTTGGAGTGSACCAATGCTCA
 TCAAGCTGACAAATAAAGTTAATGATGATTTCCAAAAA

<p>SEQIDNO.: 9</p> <p>GGAGCCATTCCTGTTAATAGTTGCTGTTGCTGCACTTCCGTCCTCCAGCGAGAGAGACACAGAGTGCCAGGCCCGCCGCG CGAGCCAGCAGCAGCGCCCGGCGCGCAGCGAGGAGCCACACAGAGAGGGCGTGTTCGGGGTGGGGTGGGGTTCCGCT ATGTCGGAATGAGATTGCGGGCCAGCACAGCTCCTCTCTCTCTCCACAGCAGAAACCCAGAGAAACACACAGCAGCAGCC AAGAGAGAGGAGAGTAGGTGAGTGGAGAAACAATCCCAATCTCTCTCCACAGCCGACAGAAATTCAGAAAGAGGCTGCGGAGC ATCACCTTAGACCCCTCAGCTAAATGGCAGTGGTCCCAAAGCGGATAACATCTATGAATGGAGATCAACCAATCTAGGGCCTCCA GGATCCGTTATGAGGGTGGTATTCCTTCGGATAATCATTTTACACCAATATCCCTCAAGCCTCCAGAGGTATCAATTCGG ACAGAAATCATATGATAATTAACAGTCAAGGTGTATTTTCTGGATAATCACTTTACACCAATATCCCTCAAGCCTCCAGAGGTATCAATTCGG TCTAAAGTCCCTTTCTATCTGCTCACTTTTACAGACTGTAACTCTCGGACCCCTTGGTGGAGTATTCGCCACCTCACACTAACCAT ACCAACAGCAGACATGACAGAAATGGCCAGACAGTGGACCAAGAGATACCGTACATAATTTGGGGTTTCCACATTTCTACATTA TTGTCGTCCACAGAGAGAGACTGCTTATGATTTTGAAGGGTCCAGGAGGTTGGATATTTGGGTTTCCAGATTTCTATACACAG AATATTACTAGTCTATTTCCCTAAGTAATTTGTTAAGTAACTTAAAGTATCTGTACAGTAGACAGAAATGGTAATAGTACACATTTTAA ATTGTCATTAGTCTGCAATATATAGCTGAATGTAGTACAGAAAGATGTACATTTAGACATTTGGGTTCCAGTTGCTTGTAGTCTG TAATTTAAACACCTTAAITTTGGTACAGTTTACACATATGSSCATTTATGTAAGTCCCTCACAGACTACATCTTTTGTATTAA ACAAATTTGAAATTTGTTCCCTTGGAGGAAACATGATATTTTAAACAGATTTTAGAGATTTGCATCCACATATATATAAAA TGGACAGTGGTAAACACCAATATAGAGATGAGTAGGGTTTTAATTTAAAGCCAACTACTTTGTTTAAAAAAGGCTTGA ATCAGGACTTGTGAACCTGTAGTAAATAACCTTAAAGCTGTTAACTAACTGTAAGGGCTGGAATAGGACTTGCACAGTGGATTGCT TCTATGTTGGACTTCTAAAGCTGCAATTTGTTACTGTGCTTAAATAACRATTTAATAAACCCACTTAAACCAAAAAAAAAA</p> <p>SEQIDNO.: 10</p> <p>TTGCTTCCCTGCGCGAATGCTGCGGGGCTGGGGTGGAGGCTGAGGCTGGGGTGGGGCTGGGGCGGAGCTGGGGCCGAGGCTGG CGGTTCCGCTCTGCTGCTGCGCGGCTGCTGGCGGGGCTGCGCCTGGGCTGGGGTGGGGCGGCGGCGAGGGCGGCGGAGCCG CGGGGGCTCATCTGGCTGCTAGAGACGCTGCTGGTGCCTGCGGCTGGGAGGCCCTTTTGTCTACTTGTCTTTAGTAGGANAACGT TGCAATTCGATGCTTGTATGGAAAGAAATGGCAAAGCTGATGGCAAGTTGGGTTTATTTGATCCAAACCATTTGT GTCTGTGAAATCTGACCGTGGCCCTGGATGGGCTCTGCACTGTTCTCATTTATGCCAFATCAAGPAAAATATTAACGGCA TTTCCAGAGTCAACCTGTCGGTGGAGCTGTATGGCTGTCGTGATGCCTCCCTCCAGAGTGGCTCACCAAGAGCCCAAGCT CAACCCAGCAACTGGCTGTACTGTTGGTTTTACTGTTTTTTTTTAACTGGTGGTTCAGTCCAGGACTGCTACTGTGGCA GTCAATGCTGAACCTAAGAAATGCAACAGAAACCGTTCCAGTGAAGTTCCAGTGAACCTTCAAAACCAATCAACCACTCAT TATCTAACTTCAATGAAATGAAATCAAACTTTTGTGTGGCAAAATGTAACTCACTGATTCAGTCTTGTGTGTGTATTTG TTGCTCTGACACACCTTGTCAAAATGGTTTTAAGCGGACCACTTTTGTGTTGTTATGTTGTTCAATTAATAGGTAATAGGAAA AGAGAACAAATTTGATAATAATAAAAATGTTTAAATATATACAAAABAAAABAAAABAAA</p>	<p>SEQIDNO.: 56</p> <p>MSDDSRASITSSSSSSSSSSSSSQOQTE KETNPKKESKVSMKSNKLLS TSAKRIQRELADITLDFPPNCSA GPKGDNIEYWRSTILGPPGVIYE GGVFLLITFTPEYFPKPKVTF RTRLYHCNINSQGVICLDILKDN WSPALTTISKVLLSICSLLTDCNP ADFLVGSIAFYMTNRAEHDRMA EQWTKRYAT</p>	<p>SEQIDNO.: 57</p> <p>MGAWEI GAEGAAGSLLLCRALLA AGCALGLRLGRGQGAADRGALIW LCYDALVHFALEGPFVYLSLVGN VANSGLIASLWKEYGKADARWV YFDPITVSVEILTVALDGLSLEL LIYAIYVKRYRHFLOITLVCVCE LYGCWHTFLPBNLTRSPNLNYSN WLYCWLFFFNFGVNVLIPGLLL WQSNLELKKRHQONETSSVKKFKQ</p>
--	--	--

SEQIDNO.: 11	<p>GGTCGGTTTCTGATGTGACGGCTGAGACATGAGATCTTCAGCCTCCAGCTCTCCAGTTTTTCGTCCGAGAGATTCACATATGGAATCG GATGCCGACCAGATCTCTGTCTCGGAGTTTCATCGCCGAGACACCGAGGACTCAACTGCCCCACCCAGCTCCAGCTCCACCACCGG GCTGCACAACTGCGAGAACACCGTCCAGCTGCTGGAGAGGCTTAGACCAAGATAGACAGCCCTTCGAAATGAAAGTGTGT AAAAGCAATATAATCTGGTCAAGATCAATGACAAAATGAAAGAACTATGACCAAGTCTGATAAGTTGGAGTAATTTTT AAGTCGAGACAACCCCGACCTTGGCACCGGTTGTCAAGTTTCTACTCTTACAAAGAACTGTCCCACTGCTGAAATAATCTGCT CCAGGTTTGGCCRCRATGTGATCTTCACCTTGGATTCTTGTAAAGAGGAGACCTAAAGGGAGTCAAGAGGAGTCTCAAGAGCC ATTTGACAAAGCCTGGAAAGATTAATGAGACAAAGTTTACAAAATGAGAAAGAGAAAGAGACCCACGAAACCAACTYGGGATGAT CCGCACAGAGATAACAGGACTGAGATTCCGGAAGAAATGGAGAGAAAGGCGCTCTTCCAGTCCAAATGTGAAATATCTCAT TAAGTTAAATGAAATCAAGACCAAAAAGGTTGAGATCTGCTGCAAGATCTATAAAGATATTACATGACAGTCAATTTCTTTCA AGATGCTTGAAMAACAGCTGATAGTTGAAACAGTACATGAAATCTCTTCAACTGGATCAGAAAGAAATTTCCAGAGCCCGCAAGG AGAAAGAAACAGACTTAAATGAAATCTCTTCAACTGGATCAGAAAGAAATTTCCAGAGCCCGCAAGG AGGATACAGCATGCAATCCCGGCAATTAAGGATTAAGGCAATGAGCAATGAAAGAGAGGGTACTCTGTAAGAAAGTCAAGGATCCG GAAAGTATGACAGAGGAGGATGTTTAGTCAAGATGAGATTGACCHTCAAGCCACATTAAGAGGAGGCTTAACCACTGAGCAAGCAAGCTCAAGTT GAACTTCCACCTGCCAAGTAACTTAATGCGAAGACAAAATATCTTTGACCTGATACATATAGAACATATCACATTTCA GGCAGAGATGAGCAGGATTAATGAGCAGAAATTAACCCAGCCCTCACAAACCCCTTCAAGTATAGTCTGAGCAAGAAATA GCAGAGTCGGGAGAGAACAGCCTGGAGACCTGCACAAAGCCATTAAGAGGATGTCAGGGCTCCCGGGAATGACATTTGCTG CGATTTGGCTCATCAGAACCCCTGCTTCAACCAACTTGGGATTTGACCTGTATAGATGTTCTGGCATCCATAGGABAT GGGGTTCAATTTCTCGAATTCAGTTTGGAACTAGACAAATAGGAACTTCTGAACTTCTGCTGGCCCAAGATGAGGAAACAA TAGTTTAAATGATATGAGAGCAATTAACCCAGCCCTCACAAACCCCTTCAAGTATAGTCTGAGCAAGAAATA TATCAGCTGCAAGATGATGATCATAGGTTTTCAGGAGACCTGTTCAACTTCATCAGCTAATCAATGAAATGCTTGGAGCCAT CAATCCAGGATTTACTTGCATTAATCAAGTCTATGCAAGGGGATAGCTAATGGAACCACTGCTGGAACTTGGGCAAGCT TGGGAGACGCTTCACTTGGCTCGAAGTCAAGATCTCTCCATTTGGTTGACTTCTTGTACAAACTGTTGGAA CCTGGATAGCCAGCCCTGGAAACACAGTTCTACACTGTAGTATGACATGACAAAGCTGAGTGTGAAAGCTTTTGGCTCAG GAGCAGCCACCTGGATATAGTTAAACAGGCTGAGAAACTGCTCAGCTAGACATGACAAAGAGACTAAAGCTACCCAGTGTGAAGA TCTGCTTCCCGCTAATCTGAAAGTTCAATCCACCTCCACCTAGACATGAGTAAATGAGTGAATCTTCGACAGGAGAGATAGATGA GAGCGATGATGATGAGTGAACCAAGCCCTTACAGAGAGAGGCTCACCCAGACTCAGAGCTTCTGCTCCACTCTCCACAGCAT CTCCCCCAGGACAGCTGGCATGCTCAGGATTCAGCATCAAGGACAAACAGCGGCTCTCTATAGGAGCTTCCACCAACAGAT CTTCTTCCACAGCACAGACTGCCACATCACCAACAGGAGCTCCCTCTGCTCCCTAGGAAACCCCGGAAAGGTTCAAC TGGCCACCTTCAACTCTTAGCAACCCAGACTTCTAGTGGAGCTTCCACCTTACAAAGAGAGGCTCTCTCCCAACCC CGGACACAGAGACCTTATCCGACCTTCCAGCTACTCATGTTGGGCCCCCAAGAGCGGAGTCTCTTGGGTTAGAGATGG GGTCCATCTCTTAGTAGACTACAAAACAGTTTAGGAGATATCCAGCAGTATCCAGCTAGCAAGCCACCATCCCGCTGG CCCAAGATTTCTTCTTAAACTTACTCAGAAAGTGGCACTAAGGAAACAGATCATCTCTCCCTAGACAAAGCCACCATCCCGCCCGA</p>
SEQIDNO.: 58	<p>MRSSARLSFFSFRDLSLWNRMPD QLSVSEPIAETTEDYNSFTTSSP TTRLNCRNTVTLLEALDQDRT ALQVKKSVKALYNSGQDHVQNE ENYAOVLDKFGSNFLSRDNDLIG TAFVKFSTLTKRELSTLLKMLLQ LSHNVIFTLDSLLKGLKGVKGD LKRPFDKAWKDYETKFTKIEKEK REHAKQHGNIWRTBITGAEIAEEM EKERRLFQIQMCEVILKVAEIKT RKGVDLLOMLIKVYHAOCNEFQD GLKTADKLYEIKLAADLYNIK QTODEEKKQLTALRDLIKSSLQL DOKEDSQSRQGGYSMHQLQGNKE YGSEKGYLLKKSDBGIRKVVQRR KCSVKNGLITISHATSNRQPAKL NLLTCQVKFNAEDKKSFDLISHN RTYHFQAEDEQDYVAVIWSVLINS KEEALTMAFRGRQSGAGENSLEDL TKAIIEDVQRLPNDICDCGSS EPTWLSNLGLLTCIECGIHR MGVHISRIQSLLELDKLGTSLELL AKNVGNSENDIMEANLPSRPPK PTFSSDMTVRKEYITAKYVDHRF SRKTCSTSSAKLNELLEBAIKSRD LLALIQVVAEGVELMEPLLEFGQ ELGSTALHLAVRTADQTSLEHVD FLVQNGNLDKQALGNVTLHYC SMYSKFECLKLLRSKPTVDIWN QAGETALDIARLKAATQCEDLLS QAKSGKFWPHVHEVEMNLRQEE IDESDDLDJDDKPSPIKERSPRP</p>

```
AATCTTTCAGAAATCAACAGTGGCAGAGTTGCCACAAAGACCACCACTGGAGACTGGCCCCCAAAGCCCAAGAACTGGCCCC  
CRAAGCCCCAAATGGAGATTTCGGCTTAGCCGAGAGACTGGCCCCCAAACAACCAAGCCAGCTGGGGACTGGCCCCCAACCCAGACCCC  
CTCAGACTTACTCCCAAACCAACAGATGAGGACCTGGCCCCCAAACAACCAAGCCAGCTGGGGACTGGCCCCCAACCCAGACTGGAGA  
TGTCTCACCACGACTGAGCAACCTCTGAGTCACTGAATCACTCACACCACTTGATCTATCCCAAAATGTGCAGTCCAGAGACGC  
CATCCBAAGCAGATCTGAGACTCCAAACGACTTCCAGCTGACCGTACTGACAGAGCCCGTACACTGCCCCCAAAAAAATCAATAC  
GGGAAAAATAAGTCAGGGGAGAGGAGGAGCACTTATGACTGGCAGGAGACAGCTGACAGCTCACATTCATTCAGGGAGAGAT  
GATATCGTCAACAGGGGAGGAGCAGGAGTGGATGGACTGGCCCACTGAGGAGCAGCTGAAAGAGGGGGCTTTCCAGAGTGC  
CTTTGTCATATCTCTGACTAGCAAAAGCGAAACTTAAAGATTCACACTCCATCTCANGCAGACTGCTGCCCTCAITGTAACC  
CTGGCCAGAGTGTATATAGTCTGTATACAGAGTAGAAACTCATGGNAGGGCCACTCAGGAGGGGATATAATGTTGTTGTA  
AATATCTGTGTTTTCTGCCCTTCAACAGTAGGTAGCTTGGACCCTGGACCCTGGCCCTTACCTGCTTGGCCAAAGCATCCTTGCCA  
TCTAGSACTTACATCTCTATGCTGTTCTACAGCAACCAACAAATAGGAGTATAGGAACCTGGCTTTGTCRAATAGRAGTIG  
GTCTCCAGCAACCGTTGAAAGGCAATGACTCTGTTCTAAACAATAGGATTAAGGACTGCTGGCTTTGTCRAATAGRAGTIG  
GCNAAAGGTGGTCTGTTTTCCAGGTGAACCTTTTAGCTCCATGACAGACTGCTTACCTTACAGCAAAATTCACACTGACCCCAA  
ACNAAACTTACTTGTGTTTAACTAGCAAAAGTCTCAATGATTTAAACAAGTTTAAACAACACTATGAGTTCAAAATTCACACTGACCCCAA  
TATTACCTCATATGCAAAATAACATATCTTCATGACTTTTAAACAAGTTTAAACAACACTATGAGTTCAAAATTCACACTGACCCCAA  
CAAGACTGCCAGAAATATGCTCTACATTAAGCACTTTAGAACTTACTGAAATCTGCCCTTATGAGTCCGCCCCCTGATA  
GATAAGTGAATGTACATTTTTTAACTTGAATTGCAATTAAGCAACTTTTAAACAAGTTTAAACAACACTATGAGTTCAAAATTCACACTGAC  
CTTTCTCAGAGTAGCATATGTTATGATGATGCAATCTCAGAACTTAAACAAGTTTAAACAACACTATGAGTTCAAAATTCACACTGAC  
ATTTTCTTAGTTTTGTTTGGACAAATTTAACTTTTAAACAAGTTTAAACAACACTATGAGTTCAAAATTCACACTGACCCCAA  
CTACTATGTAGAAATCCAGGTCGAACCAAGTTTTCTTTCCACTGTGTTAAACCCTAAATYAGATAAATTTTCCAG  
TCATAGCTCTGTCACCTCAGTCAATTCATACCAAGTTTTGAGCCTCTGATGAACTGCTTTTACATCAGCTGATTTGAGAA  
TCAGTTTTCTTTCTCCAGCCNITTTTTACAGTCTCAGTCAACATGTTTATGAGTCTTTTACATCAGCTGATTTGAGAA  
GATGCAATAGTTTACTCCACAGTCTGAGAACTGTTCCAGAGTCCGAGCTCAGTCAATGCTGCTGCTGGCCTACATTTGCCCTAAAT  
TGCTATTTGGCACAACAGAAACTAATATTTTTAAGCAGAACTTGGCAATGAGTGAAGATTTAAATTCACAGRAGCAC  
AATCCCAACCCCTTAGGAAAGCCCTTCCATCGTACAGTCTAGTAATATTAATTTAGTCTGCTTAAGTGGTGTCT  
ATACAACTTTGATAGCCCTAATAAATAAACCCTGATGACAACCTGCAAAATATTTACAGCTGATGAGAAATTTTGGAGAGTGT  
TAAGCAATTCCTCAGTGTGAGGCAATGAAATVCCACCAACAGAGCATGAGGAACCAGTGAACATGCTGGAGTTCAGTCTCAGGCTCAT  
CTGGCAGTTTAGAGCCTCGGTACTGAAGCACCAGGTTCCGGATGAGTCTGATCTGAGTTCAGTCTCAGGCTCAGTCTCAGGCTCAT  
CAFTTACACTTTAACTTTAGAGCTGTTTTTTTCTGTTGGCTAGACTCTTTCATGATCTCAAAATAACTGGTTTTTT  
TCAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
CCTTTTGCAGCACTTACAGCACTTTTAAACCTTTTTTCTAGTTTTTGTGGTTTTTCTTCCATCAGCAAAATTTAGGTT  
CTCTTACCCAGCTTACTGTGGCACTTAGGAAACTCAGTAGAATACTTGGGATCTTGTGTTAGTTAGTCTGATCTGATC  
TTAAACTCAGTAGACCCTAATCTCAATTTGTATATATATTTGAAGATATGGAACTTATGCAAAATAAATAAATAAATAAATAA
```

```
QSFCHSSSISPQDKLALPQFSTP  
RDQKRLSYGAFWQIFVSTSTDS  
PTSPITTEAPPLPPRNAGKPTGP  
PSTLPLSTQTSSTLSSKRRPP  
PPFGHKRIYLSDFSPFLPHGFPN  
KGAVPWGNDGSPSSSSKTTNKE  
GLSQSSSTSSAKTALGPRVLPKL  
PQKVALRKTDLHLQKATIPHI  
PQKSSQLAELFOKPPGDLPPKP  
TELAKEPQIGDLPPKAGELPPKP  
OLGDLPPKQLSDLPPKPKMDL  
PPKPQGLLAKSQTGDDVSPKAQ  
QPSVYLKSHPLBLSFNVQSRDA  
IQKASEDSNDLPTLPTLPTVPPL  
PRKINTGKNKVRVKTIIYDCQAD  
NDELTFIEGEVLIVTGEDEQEW  
WIGHIQPERKGVFPVSPVHIL
```

AGTTCCTTTCCCCAGAGGGGAAGTTATGTTCTGCAADTAGTGTGCTTATTACTGTTGAAACAGCAATTCCTATTATT
TPTTGGCCTAGAATTCAACATGTTGTATAGGATCCCTGTAGTCCACTAGTTAATAGCCGAATTCATCTGGATGTTACCAATCA
AACATCAGTACACTTGTCAATTCACATGTTTATATGTTGACAGTTTTTCAGTACTGTATGTTAATTTCTACTTTTTTTAATATT
AAATTCCTTTTAAATPAAACATATTCTCAGTTGATCCC

SEQIDNO.: 12

CTTCCAGAGCAATATGGCTGGTTCCCAACAATGCCCTCACTTCCCTCATATACTCTTTGGCAGCTCACAGGTCAGCAGCCCTCTGGA
 CCCGTGAAAGAGCTGTCGGTTCGGTGGGGCCGTGACTTCCCTCAAGTCBAAGTAAGCAAGTTCAGCTCTAFTGTCTGCG
 ACTTTCACAACAACCCCTTGTTCACCATACAGCCAGAGGGGCACTATCATAGTGACCBAATCGTATATAGGGAGAGTAGAC
 TTCCAGATGGAGGCTACTCCCTGAAGTTCAGCAACTGAAAGAGTACTCAGGATCTACTATGTGGGATATACAGCTCATCA
 CTCAGAGCCCTCCACCCAGGAGTACTGCTGCATGCTACGAGCACTGTCAAAGCTTAAGTACCATGGGCTGCGAGCAAT
 AAGAAAGCCACCTGTGTGACCAATCTGACATGCTGATGCAAGCACTGGGAGAGGATGATGATTAACCTTGAAGCCCTGGGCCAA
 GCAGCAAYGAGTCCATAATGGGTCCATCTCCAGCCCACTCTGCCAGGACTCTGTGAAGTCTGCTGATGACCCAGATTCCTCCATGTC
 AACCTGTACAGCAAACTTCTCAAGCCCACTCTGCCAGGACTCTGCGGAACTCTTAACAATGCCCCAATCTGGAGAGACACAGACAA
 GAGTACATCGAGAGAGAGAGAGTGGACATTTGTCGGAACTCTTAACAATGCCCCAATCTGGAGAGACACAGACAAAGAA
 ACGATCCCTCACACTAATAGAACATCTTAAGGAACTCCAGCAATAAGTCTACTCCACTGTGGAAATACCGAAAGAGTAGAA
 AATCCCACTCACTGCTCAGATGCCAGACACACCAAGCTAFTTGTCTATGAAATGTAATGATGCAACTGCTGAGAAATG
 TCCTGCTCAAAAATAACAATTTCCGCCCAAGAAACATCAGAGAAATCACTGATTTGACTAGAACTCAAGAGAGAGAGAGT
 AAGAACGTGACTTTTTTCAGGATAAATATCTCTGATGCTCTTAGATTAAGATTAAGTTGATGATGATGATGATGATGATGAT
 TCCTCAACCAGAGGTTAATCACTTAATGACACTGTTGATTAATGATGACTGTTGATTAATGATGACTGTTGATTAATGATGACTG
 CCTATGAAATGTAATGCRAGTCCACATAITTAATGACAGCTGTTGATTAATGATGACTGTTGATTAATGATGACTGTTGATTAAT
 TCCATCCAGGCTTGGATGTAAGATTAATGACAGGCTTGGTACAGGAGGCTTGGTACAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 AAGAGCAGATGCACCTGACAAATGGATTAATTTGGTCTATAAATACTAGTCCAGACTATGCTGAGCAGTATGCTGAGCTTAAATGG
 TCGACGCTGCTGTGCTCATGAAATGGCTCCAAATGATGACTTTCATGAGCAAGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 CCAGAGGCCAGGTGGATCCACAGGACTGAGGTCAAATTCACAAAGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 ACTATATGAGAGACACAGAGTGTGATGCCCCCAAGGACAGGCTCCAGCCAGGCTTCAATTAAGCACTTGTGCTGCAAAAGAAA
 AGTCTAGGTTTAAAGCTGTCCAGAACCCATCCATTAAGAGAGAGGAGTGTGAAATGCACTTGTAAATCTAGTGTAGGAGACTTG
 GAGTCAGGAGTGAAGTGTGGGACAGGGGGCTGATCTGTAACCTTTAAAGATGTTAAATTCATTCRAATAGATAITTA
 TTAGAACCTATGCGGCCGCGATGGTGGCTCACACCTGATCCAGCACTTTGGAGGCCCAAGGTCGCTCATCTGAGGTC
 GGAGTTCAAGCAGCCTGGCCAACATGGTGAACCCCACTCTACTAAGATAACAAATTTGCTAGCGGTCGTTGGTGGCAGCTG
 TAAATCCAGCTACTCGAGAGGCCAAGGATGAGAACTCGTTGAACCTGGAGGTTGAGGTTCCAGTGAAGTGGCAGCTGAGATGGCACTG
 ACTCCGCTTAGGACAGGAGGAACTCCATACAAACAAACAAACAACTGTGTAGGTCAGTCTGGCAGCCTGAGATGAGAGAGAGAG
 ATCCCACCAACAGAGCTCACATCTTACTTAAGTGAATAAATGGGGAGGGAAGGGGAAAGGCTTTTGTGATAGT
 TCCCTGACACATATCTGAAATGGAGCTCCCTACCAAGTATGAAAGTGTGAAATCTTAATAACAATGCTTTGTTGGGCAAGAA
 TGGGATGAGGATATCTTCTCAGAAAGCAATGGAAGGAAATGAGCAGATCTCTCCCTACTGCAAAACCCCTATTGTAGTA
 AAAAGTCTTCTTTACTATCTTAATTAACAGATAATTGAGATTCAAAATAAAAATAAAAA

SEQIDNO.: 59

MAGSFCLTLIYLWQLTGSAA
 GEVKELVGSVGAATVPLKSKVK
 QVDSIVWTFNTTFLVTIQEGET
 IIVQNRMRERVDPPDGGYSLKL
 SKLAKNDSGIYVVGIYSSSLOOP
 STQEVLYVHYEHLKPKVVMGLQ
 SNKNGTCTVNLKTCMEHGEEDVI
 YTWKALQAAANESHNGSILPISW
 RWGESDWTFCVARNPVSRRPSS
 PIIARKLCBGAADDPDSSKVVLC
 LLLVPLLSLFLVGLFLWFLKRE
 RQBEYIEBKRVVICRETPNICP
 HSGENTYDITIPIHNTILKEDP
 ANTIVYSTVEIIPKMNPESSLLTM
 PDTRLEFAYENVL

<p>SEQIDNO : 60</p> <p>MSSDRQRSDDESFTSSGSSDAD QRDPAAPERPEQEERKESATQOK KNTKLSKTTAKLSTSAKRIQKE LAEIHLDFPPNCSAGPKGDNIYE WRSTJLGPSSVYEGGVFFLDIT FSSDYFPKPKVYFRRLYHCNL NSQGVICLDILKDNWSPALTIK VLLSICSLLDNCPADPLVGSIA TOYLTRAEHDRIARQWTKRYAT</p>	<p>SEQIDNO : 13</p> <p>CACTGCGGGCCGGAGGAGCGGCGGGGCGGAGGCTACAGCGCGGGGTCTCCGCGTCCCTCGCCCTCGCC GGGNGTCGCGCCCTCGCCAGCCGAGTCCACCCCGCTTTTTCGAGGCGCTGGGCGCCACCCCTCGGCGGGAGCCCGG CACTGCACAACCCCTCGGACTTCAATGTTCCACACTCCCGGCGAGCTCTCGGCTCTTTTTCCTCCCGCCCTTCCC CCCCACAGCTGCTCCATTTCTTAAAGGAGGTTTTTCTCTCTCCCTCCCGCCACACCCGATAGCGCGGCGGCGGCGG GGGCGCGGAGTTTTCCAGAGATACTTCCACCAAGAJGTC CAGTGAATAGGCAAGGTCGATGATGAGAGCCCGCAGCAGT GGCAGTTCAAGTCAGATGCGGACCGGAGACCCGCTCCAGAGCCTGAAGAACAGAGAAAPAAACCTTCTGCCACCCGAGCAG AAAAACCAAACTCTTAGCAAAACCCTGCTAAGTATCCACTAGTGTAAAGAAATTCAGAGAACTTCTGATGAATACCTTT GATCCCTCTCTANTTGCAGTGTGGGCTAAGGAGTAAACATTTAGATGAGATCACTATCTTGTGTCACCGCGGTTCTGTA TATGAGGTSGTGTTTTTCTGGATATCACATTTTCACTCAGATATCCATTTAAGCCACCAAGGTTACTTTCCGCGCCAGAAFC TAFCACITGCACATCAAGTCAGGAGTCACTGCTCGACATCTTAAAGACAACTGGAGTCCCGCTTGGACTTTCAAAGSTT TTGCTGCTATTGTTCCCTTTTGCAGACTGCARCCCTGCGGATCTCTGTTGGAGCATAGCCACTCGTATTTGACCAACAGA GCGAACA CGACAGGATAGCCAGACGATGGACCAAGAGATA CGCAACATAATTCACATAATTTGTAGCAGTGTGSAAGCAGAAG GCATCTTCTCAGTGTGCAATCTTTATAGCTTTACAAATACCGACTTCTGTATATAGTATATCTGATCTTACTCTGCTTTAI CCTTTGGAGCCTGGGAGACTCCRRRAAGGTAAATGCTATCAAGATGAACTTTGTAGCTGAGATTAGTTATGTTTARAAGCC TACTTGCAGTCTTGTCTTTGGGATCAAAATGATTTTGTGATGTAAGGATCTGGTCTGAAATCTCCAAATATATA GTGCAITTTAGCCTAATTAATCTGTATGAAATGTTTACCTTTTACCTTGTCTAGTTTGTATGAGAGGATTTCTCTTTT ATCTATTCTGAGTATGTTGTTCTATGTTGAAATGTTTACCTTTTACCTTGTCTAGTTTGTATGAGAGGATTTCTCTTTT ACCTTTGTAGCTCAGAGACCTGATGATCATCTCAAAACCAATAAACATGCTCTGAGGAAATAAATAAATAAATAA</p>
<p>SEQIDNO : 61</p> <p>MARGSALLASLALLAALSASAG LMSPAKERGWTLSAGYLLGPH AVGNHRSFSDKNGLTSKRELRFH DDMKPSSFDRSIPENNIMRTLE FLSFLHLKERGALDRLLDLFAAA SSEDIERS</p>	<p>SEQIDNO : 14</p> <p>CCACGGTCCGGACCCGGCCGCTTCGCCCCGCTGTCGCGCCGCGGCAATGCGGTGAGCCGCCAGGCCCGCAGCCACCC GNCCCCGCGACCGGACTTCCGCCCCAGACCCGCCACCCGACCCCGACTCCGAAACCGGGGCGCAGCCGAGCTCA AGATGGCCCGGAGCAGCCCTCTCTCTGCCCCCTCCCTCTCGCCCGGCGCTTTCTGCTCTGCGGGCTCTGCTGCGCGCA AGGAAAGAGGCTGGACCTGAACGCGGCTCCCTGCTGGGCCACATGCCCTTGGCAACCCAGAGTCAATCAGCGCAAGA ATGGCCCTCACCCAGCGGAGCTCCGCCCCGAGATGACATGAAACCGGAGCTTTCAGAGTCCATACCTGAAACAATATCA TGCGCCAATCATGATTTCTGTTTTCTTCTGCAATCTCAAGAGCGCGGCGCTCCGACCCGCTCTGATCTCCCTTAAGATAAGGA CCTCAGAGACATGAGCGGCTCTGAGAGCCTCCGCGGATGTTGTCGTGCTGTAACCTGPACTCAACCTTAAGATAAGTTT TBACTCGGCCAATTTATGCRAGTCAGCCATTCCTGCTCTCTGCTGATGTTGTTGTTTCAATTTAAGATTTTTTTTTT TGSTAATTAATTTGAGTGGCAATAATAGAAATAGCAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA</p>

SEQIDNO.:62
MRAVSLRLGLVWGKLGKRYPPWP
FKIVNFPDLKPKPRKCFVVFV
FGTEDHANIKVQQLKPYAHKEE
MIKINKRKRFOQAVDAVEEFLRR
AKGDOTSSHNSDDKRRNRNSSE
ERSRPNSSGDEREKLSLSEKVK
NMGEEKRVSSESSSEGSKSPLK
RAGEOSPRKRGRPPKDEKDLIIP
ESSTVGMWAGPMAAFKWOPTAS
BPKDADPHHFFLLSQTKEPAV
CYQAITRKLKICEESTGSTSIQA
ADSTAVNGSIPTDKKIGFLGLG
LMSGGIVSNLLWGHITVVWNRT
AEKCDLFIQEGARLGRTPAEVWS
TCDITPACVSDPKAKDLVLGPS
GVLQGIAPKCYVDNSTVDADTV
TELAQVIVSRGRFLEAPVSGNQ
QLSNDGMLVILAGDRGLYEDCS
SCFOAMGKTSFPLGEVGNAAKM
LIVNMVQGSFNATIAEGLTLAQV
TQSQCOTLLDILNQSQGLASIFLD
OKCDNILQQNFKPDPFLKYLQKD
LRLALALGDVNHFTPMVAANE
VYKRAKALDQSDNDNSAVYRAYI
H

SEQIDNO.:15
CGGTGGTGAGATGGGGTCTGTGAGTCTGGCGCTGGGCGAATTGCTGGGGGAAACTCGGCGAATATCTCTCTTGGGCA
GGARAGATGTTAATCCCAAGGACTGAAAGAACCTCGCGAAGAAATCTCTTTTGAAATTTTGGAAACAGANAGATCAT
GCCTGGATCAAGTGGAAACAGCTGAGCCTATCATGCTCTAAGAAGGAATGATAAATTAACAAAGGGTAAACGATTCACGAA
GCGGTAGATGCTGTGAAAGTCTCTCAGAGAGCCAAAGGGAAGACAAGGAGTCTTCTTGTATGACAAAGAAATGGA
CGTAATCCAGTGGAGAGAGTGGCCAAACTCAGGTGAGGAAGCCAAACTTAGCTGTCTGAAAGAGGAGGTCGAAAGAAC
ATGGAGAGGAAAGAGAGGGTGTCTTCAGSCTCTTCAGAGAGAGCTCCAAATCCCCTCTGAAGAAGAGCCCAAGACAAATCC
CGEAGCGGGTCCGCCCCAAGAGGATGGAAGACTCCACACTCCCGGAGTCTAGTACCCTGAGGGAATGGCCGGAACCGATG
GCGCGTTTAATAGCAGCCAAACCGCAAGGCCACTGTTAAAGATGCAGATCTCTCATTTTCCATTTCTCTAAAGCCTCAAGTCC
AAGCCAGCTCTGTACACAGGCAATCAGGAAATGTAATAATGTAAGAGGAACAGGCTCCACCTCATCCAGGCAAGTGC
AGCAGCGCGTAAATGGGCAATCACCCACAGACAANAAGATGGAATTTTGGCGCTTGCTCATGGAAGTGAATCTGGA
AACTGTAAATAATGGGTCACACAGTACTGTGTGAAACCGCACTGCCAGAGAAATGTAATTTGCGCTCTGGAAGGAGGAGTCTC
GGAGAACCCTGCAACCTGGACATCACTTTCGCGTGGAGTCCGAGGGCCCAAGSACCTGGTCTG
GGCCCCAGTGTGTGCAAGGATCCGCCCCGAGGATGCTAGCGACATGTCAAGTGGCCAGTGCACAGCTGCACCCCTCACTGAGCTG
GCCAGTGATGTGTCCAGGGGGGGGCTTTCTTGGAGCCCGTCTAGGAAACCTGAGGAAATCAGGCTGTCTAATGACGGGATGTGGTG
ATCTTAGCGGCTGAGACAGGGGCTTATATGAGGACTGCAGCAGTCTCTCCAGCGATGGGAGACCTCTTCTCTCTAGTGAA
GTGGCRAATGCGCAAGATGATECTGTATCGTGAACATGTTCCAGGAGGCTTCAAGGAGCTTCAAGGAGGCTGACCTGAGGCTGACCCCTGGCC
CAGTGACAGGCCAGTCCAGCAGACACTTGTGAATCTCACTGAATATACCTGAATATACATCAGGGAAGTGGCCAGCATCTTCCTGGACCAAGTGCCAA
AAPATCTTCCAGGAAACTTAAAGCTGATTTTACCTGAAATACATCAGAAAGGATCTCCGCTTAGCATTGGCTGGCTGGTGTATGG
GTCACCAATCCGACTCCATGGGAGCTGCAGCAATGAGTGTACAAAGAGCCAGGCGTGGAGCAAGTCCGATCCGACCAACAGATATGTCC
GGGTGACGAGCCTACACTAAGCTGTGCACACCCGCTCCACTCCCTCCAACTCCCTTCTATCTCAAGACTTTGAGCTTTGAGCTTTCTCAGATG
GGGTGGGGGCTTCCCCTGAGCCGCTGGGAGGAGCAAGTGTACAGAGATGGCGTGGGGAAGGCTCTTGAAGCTGGGCA
CTGGCCCCCGAGCGAGTGGCTGTGTGTTCCACACACACACACACACACAGGCTCTGAGGAGTTCCTGAGCTGGGCA
AAGTCCCAGAACTGCTGCTGGCTTTTCTTCTCGAGTTGTCTTAACTCAACCCCTTCCAGTCAAGGAACTAGAACTAGCA
AGGAGTGGAAAGCTTCCCAAGCTTCCCAGAGCGAAGAGGCTGTAGTCAATCTCCATCCCCTTCCGATTCCTCAAGGA
GAGGCTTGGGCCCAGATGAGCCAGTACAGACTCCAGACAGGAGGGGCTTGGGGCTTCCAACTCCCTAGTCAAGGAAAGG
TGTTCAGCTTAAAGCTTCAAGTGGACCCAGCGCTTCAATGAGGCTTTGTGAACTGAALAGACTGGGAGGTTCCCGGAGAGAT
GGGGCCTGGCTTCCAGGAGTGCAGCAGCAGCCGCTGAGGTEAGCTGGAGGCTTCCGCTTCCCGCTCCAGCCCTCGAGGAGATGCC
CCAGATCCACTGACAGCCGCTGGCTCTCCCTAGGCTTTPAGTATTTGATTTGATTTCCATCTCTTTGGAGGAGTCC
TCAGGCCACTAGTGAAGCCAAAGGAGTGGGGGCTTCTCTGTTTTGTTCCGTTAGGCCAAAGCTCTTCCAGGCTC
CTGAAGGCCACTTACTGCTGGTCCCTCCAGTGGTCCACTCTCCAGCCCTGCTCCAGGCTCCCTGCAATGCCACCCTC
TCCATGCTCCTTCTCCCTTCCCTGAGGAGCAGTATCTTTCTGCTGTCTCTTGGCCGAGCCAGCCAGCTGACCAAG

ATGAGCAFTTCTTAGGCTAGCTTGAATACGGAAACGAGTGTTCACCTCCAGCCAGCATCATGCTTTCGGTGTTCCTCGGCCCC
 GGGGTCTGTCGGGNGGANGAGAACCTGGSCCTGACCTACCTGACTGACTGGCCCTCCGAGGTGGGTCTGGACATCTCTAGAGCCCC
 TACATTTGCTCCTTGGATAGGGGACCGGGGGGGCTTGGATGTTGCAAAAAGTTACCCAGGGATGTCAATTTTATTCCTC
 TGCAIGGGTTGGATTTCCAAATCAATAATTGCGAGAGAGGCCAGCATTACGATGCAATATGTAATTAATADAGGGGTGGCCA
 CACTAGGGCGGGTCTTCCCCCTACACAGCTTGGCCCCCTTTCAGAGATTAGAACTGGGTTAGAGGATTCGAGACACAGCCTG
 GGGAGGCGAGGAGATGCCCTGTCGGGTTTTAGCACAGTTTCACTGGGATTTGAGCATTTCTGTCTGAACACACAGCCTG
 TTCCTAGTCCGCGGACACACTGGGGTGGGGGGGAGATGCGGTAATGAAACCGGTTAGTCAATTTTGTCTAATAATTTT
 GACAACTGTAAAGTTCCTTTTANGAATAATTTCTGTTTAGCTAATTCACCTTCTTTTGAATCTTCCCTTTAAGGAGAAAA
 TGTGACACTTGTGAAAAGCTTTGTRAGAAAGCCCTCCCTTTTCTTTAAACCTTTAATGCAAACTTAGGTAATTAAGGTTGT
 GAATTTTATTTTGGCTTGTTTTAAAGAACATTTGTC.TTCAGATAGGATGTGTGATATGTTTAAATGGCAAAAACAABAACA
 TGATTTTGTGCAATTACAAAGCTACTGCRAGAAAAATAAACAATCTTCTGGTACACAAAARAAAAAARAAAAA

SEQIDNO : 16	<p>AGTACCCTGGTCCAGCTTCTCTGCAACGGCCCGAGGAGCTCAGAGCTCCACATCTGCACCTTAGTCAATGACCCAGGACCCAGGGCAGC ACTCCCTCTGTTACAGCCCTTAGCACTTCTTAGGTTTCAACTGGAACACAGAGAGCTGCACGCTCCGCTGGTGGACAGCTGG GTTGGAGACAGCGGTCCAGTAGCCACTCCTGGGTGGTGGAGCCGCCCAAGATAACAGCTGCCAACCMAACGGGTGG CCTTACCAAGTGAGTACAGCCTGGTCTGTGAGCCCTGCGCTCGAGGTCGCCGGAGCGCGTGAACATGTCCTCGGCCCT GTCCCTGGCTTACCAACAGCCCTTCCAGCTGTGGCTGGCCCAAGTGCACCAAGAGTGGGGAGACATGATCCTCCAC CGACTGTCTCTCTGGCCCAACAGCTCAACAGAGGTCCGGTCCAGGTCCAGGACAGCTCCCAAGACAGGAGCAGACAT TGCTCTGATCGATGGCTCAGGACATGCTCTCCGCAACTTCCACGATGATGACTTCCGAGGACATGAGTACATGTCAC CEGAGACCCAGCCAGTTTCCCTGATGAGTCTCCAAABATCCAAACACTTCCATTCAGAAATTCAGGGCAGCTC AAACCCCTCAGCCTTGGCTTCTGATCACAGCTGAGGTTTACATACAGGCCACCGCCATCCAAATGCTGTGACCCGAT GTCCATGCTCATAAGGGCCGTAGGATGCGGCCAATAATCTCATGTCACTGATGGGAAGAGAGCGCACAGCTGGA TTATAAGGATGTCACTCCCATGGCTGATGAGCAGGANTCATGAGTCCAGGATGAGTCTTGAATGCTGAAAGATAATCA TTGGAAGAAATTAAGATGACATTCATGAGGTCAGGACCAAGAGACTGAGGAGCTTCACTGGTGTGAGTGCCTTCTGACAAATTC AAACCACTGAGAGGAGATCTTGGCAATGAGGTAAGGACCAAGAGACTGAGGAGCTTCACTGGTGTGAGTGCCTTCTGACAAATTC CITCAGCCTGTGTTCACTGAGCAGGCTGAGGAGCTTGGGGAGCTTCACTGGGACTTCCACTGGGTTACTCCACCGAGCTGGCCCT AABAATGAGCCCTACCTTCAATGATGCTCAGGAGANTGGACAGGACTTCACTGGGACTTCCACTGGGTTACTCCACCGAGCTCCAGGCA CTGGAAAGGGTGAGGCTGTCTCAGGGAGCAGGGCCACCTGGGTCGCTTGGGGCGCTTGACAGTGTGGG ATGGAGGAAGAAGGCGGAGTACGGGGACTCAGATCGGTCTACTTGGGGCTCCTCTGGTGGGCTGAGGAGCTTCCAGAGAGAGG CAGCACCGACCTGTCTCAACGGGCCCCCAATTAACAGCAGACCCAGGAGACTTCCAGGAGGACTTCACTGGGAGCTTCCAGGAGTCCAGGCA GTGGAGAGGTTGGTGTGATGCTTCTCAGGGAGCAGGGCCACCTGGGTCGCTTGGGGCGCTTGACAGTGTGGG GGATGTGAATGGGGACAAAGCTGACGAGCTGGTCAATCGGGCCCGAGGAGAGGAGAGCAGGAGGACTGAGTCTGGGTGGTCCCTGGG AGTCTGGGACCCAGCATCAGCCCTCCACAGCCAGCGGATCGGGCTCCAGCTCTCCAGGTGAGTAATTTGGGGCGGCG ACTGACGGGGTCAAGACTCACCGGATGGACTGTGGACCTGGCTGTGGGGCCCGGGGCCAGGTCTCTCCACCGAGCTCCAGGCGG ACCTGTGCTCGGGTGGGGTGGACATGACGTTCAATCCTCGAGATCCCGGTTGCTGGTGGTGGGAGCGGAGCTGCTCG TGACAGACCTGGTACATCCAAACATCTGCCCTTACATGACAAACCTTCAAGAACTCGCTGGGAGCCGAGCTCCAGGAGCTCCAGGCT TGTGACTTGGACTTGGCCCTCGACCTGCGCCCTGAGTCCCGTGGACCTCCAGGAAACAAAGAACCGGAGCTCCAGGAGCTCCAGGAGCT CCGAGCTCCGGCTGAGGACACTGTGAAACTTCACTTCCGCTGCTTGGAGTGGTGGAGGACTCTGTGAGCCCTTCCAGGAGTCT GCGTCTGAACTTACGCTGTGGCAAGCCCTCTGCTTCAAGAACTCGGCTGAGCTGGGAGTGGTGGAGTGGTGGGAGGAGCTTCCAGGAGCT CAGGCTTCCCTTACCTTTAGAGAAACTGTGGAGCCGACCAATCTGGCAGGAACTCTGGCAGTCTCTCGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTT GAAGTCTCCTGTGTTGGGATGAACCTGGAGTGAACGGCAGAACTGAATGAGTGGAGGAGAGCTCCAGGAGCAGCCAT CACCTTCTCCCAACCCCGGACTGTCTACTCCGCTACGTTGGGAGGGCCGAAACAAGGGCAGTCTGGTTCCTTCCAGCAGCTGACATG</p>	SEQIDNO : 63	<p>MTRTRALLFTALAFSLGFNLD TEELTAFRVDSDAGFGDSVVQYAN SMVVGAEQKLTAAQTGGLYQC GYSTGACRPIGLQVPPPEAVMSL GLSLAITSFSQLLACGFTVHE CGRNMYLGLCLLQVPTQLTRL PVSROCEPRQEDIVFLIDGSGS ISRRNFATMMNFRVAVISQFORP STQFSLMQFSNKPQTHFTFEEFR RSSNPLSLLASVHQLQGFTYAT AIQNVHRLFRAS YGARDAKI LIVITDGKKEGDSLVDVI PMA DAGLIYR YIGVGLAFQWRNSWK ELNDIASKPSES HIFKVEDFDAL KDIQQLKEKIFAI EGTEFTSS SFELEWAQEGFSAVFTPDGPFVLG AVGSPWSSGAFLYPPNMSPTFI NMSQENVMDSDSYLGYS TELALW KVSQSLVLAGAPRYQHTKAVLFT OVSQWRMKA EYVGTQIGSYFGA SLCSVDVDSGSTDLVLIGAPHY YEQTRGGQVSVCFLEFRWRHWC DAVLYGBOGHPWGRFGAALTVLG DUNGDKLADVVIGAPGSEENRGA VYLPHGVLPISI SPHSQRLAGS QLSSRLQYFGQALSGLDLPDGG LVDLAVGARGOVMLLRTLPULWV GVSMQFTPAEIPRSAFECRQVW SEQTLVQSNICLYIDKRSEWILG SRDLQSSVTLDLADLPGRLSERA</p>
--------------	--	--------------	--

CAGACCTGCCGATGACATTTCCCTGAGGCTTGGCTTTCCCTGGCTTTCCCTGAGGCTCGCATTAGAGCGAGTCACATGGAGCATC
CTAACCTTGCATTTTAGTTTACAGTGAACTGAACTGAACTTAAAGTCTCATCCAGCATTCATAGCCAGSTTCTGTAGGGTAACTTTT
GAAAGATATAATACCTGGTTCCTGCTATCCTTAGTCACTACTCGGTACAGGTAATTCAGAAATGAGATGCTACTAGGTAATCCCTCCC
ACRCCATACGATAPAGCAGACATTTTAAACGATACCGAGTCACTATGTTGGTCCCTCCCTGAAATACCGCATTCGAAATCCATGCA
GTGCAGTATATTTTCTTAGTTTGGAAAGCGGTTTTTTCTTAAAAAATTTAGACACGGTTCACATAATGATTTAGTCTAGA
AATACATTTCCCTAATTTCCGCAATTTCAAATAATGTCCTAATAACAAATGCGGTGATGCTGTATGTTATGTAATTTAATTTAGSCTAT
ACGTATTTATCMATGAACATTTGATCCTTATTGGCAGGATTTTATAAAGTCCGTCATTTGCAITTTGAATGTAGGGCTCAGTAAATG
ACRGAATATTTTCAATTAIGGGTAACTGGGAATAAATGGGTCACTGGAGTAGGNATAGNAGTCCARAGCTGGAAGGCAAAAATGA
GAAAGAAAAGCGGCCCTTTGGTCTACCGTTTTYCAAGTCTGTGTATCAATTTGTTCCACAGCAAAAAGAAATGCCAGGGCA
TAATGTAGCTGTGAACATGCCAGGTTGCCATTCACATTCCTGGTACCCTGATGGGTCTGATGGGTCTGCCACGTGGGGACATGTCCT
TCAGAGGCAGATCGAGAGTGGCTTTTCCTCCATTAFAACATAATGACTGTAATAAATAATTTTAAAGGACATTTACTGANAATTAACAGTATTTT
TTAACATGTGTGACTTTCAATGCTTCTGGGTTGGACTTAAGATCCAPACTGAGAAAGCAGGCCGGGCAATGGCTCATGCCCCTGT
AATCCACACTTTGGGAGCCMAGGAGGTTGGATCACTTAAAGTCAAGGTTTGAACAGCTGTCCTGCAACATGGCAAAACCCCTGT
CTCTACTAAAACATATAAATTTAGCTGGGGTGGTAGCNCATACCTTAAATCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGAGGAAATTTGC
TTGATCCRGGGAGGCAGAGGTTGTAGTGGCCGAGATCGGCCCTCCGCACTCCAGCCCTGGGTGACRAGAGCAAACTCCATCTC

SEQIDNO.:65

MDFSFLPKILDEDEXESTFYGVHG
 VSGFVVTACDMAGAMAYELVRVG
 HSELVGEIILLEGDMATIQVYEB
 TSGVSVGDDPVLRTGKFLSVELGF
 GIMGALFDGIGQRLPLSDISSQIQS
 IYIPRGVNVVSALSRDIKMDFTPC
 KNLRYGSHITGGDIYGVIVSENL
 IKHKLMLPPENRGTIVYIAPGN
 YDTSWVLELEFEGVKEKFTWVQ
 WVPVQRVPVYTESKLPANHPLLTG
 QRVLDALFPCVQGGTTAIIPGAFG
 CGKTVISQSLSKYSNSDVIIVYG
 CGERGENEMSEVLRDFPELTMEVD
 GKVESIMKRTALVANTSNMPVAA
 REASLYTGITLSEYFRDMGYHVS
 MWADTSRWAEALRELSGRLABM
 PADSGYPA YLQARLASFYERAGR
 VKCLGNPEREGSVSIVGAVSPFG
 GDFSDPVVTSATLGIIVQVFWGLDK
 KLAQRKHFPFVSNWLLSYSKYMBE
 LDSYVDKHPTFEFVPLRTKAKEIL
 QEEEDLAEIVQLVKGKSLAEIDK
 ITLEVAKLIKDDFLQONGYTPYD
 RFPFPYKTVGMLSNMIAFYDMAR
 RAVETTAQSDNKIITWSILIRBMG
 DILYKLSMKFKDPLKDGRAKIK
 SDYAOLELMDQNAFRSLED

SEQIDNO.:18

GACAGCCCTGGGTCCTGGTCCGTACAGTCTGACCTGCGGCCCCAGCAGGTAACTAACATTAATGGAATTTCCACAGCTACCC
 AAAAATCTCGATGAGATAAAGAAAGCACATTTGGTTATGTCAGGGGTCTCAGGACCCTGTTGACGCCCTGTGACATGCGCGGT
 GCAGCCATGTATGAGCTGGTAGAGTGGCCACAGCGMACTGGTGGAGAGATTAATCGATGGAGGTGACATGGCTACTATTACAG
 GTGTATCRAGMAACTCTGGTGTCTGTGGAGATCTGTATCTGCCACTGGTAAACCCCTCTCTGTAGAGCTTGGCTCTGGCAAT
 ATGGGAGCCATTTTGTATGGTATCAAGACCTTTGTCGSAATACAGACSTCAGACCCMAACATCTACATCCCCRAGGAGATRAAC
 GTGTCTCTTAGCAGAGATCAAAATGGACTTTACACCTTGCRAAAACCTCACGGTTGATGTCATATCACTGCGGAGACATTT
 TATGGAAATGTCAGTGAACCTCCCTATCAACACAAATCAATGTTACCCCAAGAACTGAACTGAACTTACATTTGCTCCAAGTATGGCCCT
 CCTGGAAATGATACCTCTGTATGTTGCTTGGAGCTTGAATTTGAAGGTGTAAGAGAGATTCACCATGGTGCACAGTATGGCCCT
 GTRCGTCAAGTTCGACCTGACTAGAGAGCTGCCAGCCCAATCACTCTCTGTGACTGGCCAGAGAGTCCCTGATGCTCAAGTATTTAAC
 TGTGTCCAGGGAGAACTACTTGCTATGCCCTGGAGCCCTTGGCTGTGMAAGACAGATGATACACAGTCTCTATCTCAAGTATTTAAC
 AGTGTATGATCACTATGTAGGATGTGTGAAGAGGAAATGATATGATGCTGTAAGTCTCGGGACTCCCGGACTCCACGACTCAGAAATGAG
 GTTGTATGTAGTACAGTCAATATATGAAAGAGGACAGCTTTGGTAGCCAAATCACCTCCAAATAGCCCTTGTCTCTAGAGAGCCCTCT
 ATTTAATCTGGAATCACACTGTACAGAGTACTTCCGTGACATGGGTATCATGTGCAGTATGATGGCTGACTCTACTCTAGATGGCT
 GAGGCCCTTAGAGAACTCTGGTCTGTTAGCTGAANTGCTGCAGANTAGTGGATAFCAGACTATCTTGGTCCCGTCTGGCCCTCG
 TTTTATGACGAGCAGCGCGGGTGAATGTCTTGGAAATCTTGAAGAGAGGAGTGCAGCATTTGTAGGAGCAGTTCCTCCACCT
 GGTGTGATTTTCTGATCCAGTACATCTGCTACTTGTATGTCTCAGGTGTTCTGGGCTTAGAATGAAATAGTCTCAGCT
 AAGCATTTCCCTCTGTCATTTGGCTCATCAGCTACAGCAAGTATATGCGGTAGCCAAATCACCTCCAAATAGCCCTTGTCTCTAGAGAGCCCTCT
 TTCGTTCTCTGAGGACGAAAGCTPAGGAAATCTGCAGSAGAGAGAGACTGGCCGCAAAATGTATCAGCTTGTGGGAAAGGCCTTCT
 TTGGCAAAACAGATAAATCACCTGGAGGTAGCAAACTTATCAAAAGATGATTTCCCTACAAARAAATGGATATCTCTTATGAC
 AGSTTTGCCCATCTACAAAGCAGTAGGGATGCTGTCAAATGATTTGCATTTATGATAGGGCTCTGTAGAGCTGTTGAAACCACT
 GCCCAGAGTGACAAATAAATCACATGGTCCATTTATGCTGAGCAGATGGGAGACATCTCTAATAAACCTTCTCCATGAAATCAAG
 GATCCACTGAAAGATGGTAGGCAAGATCAAAAGCCGACTATGCAACATTTGTGAGACATGCAATGCCATCCCTGAGCTTGTAA
 GATAGAGCCCTTGAAGATTAACACTGTGATTTCTTCTCAGCAAGCTCTATGATATTTTCTGATATTTCTGATATTTCTCATCTCAAA
 CCTTTGCTCTTTATGTCAGCTTTGAGACTAGTGCCTAAGTGTATTTGTTCCCTGTTATTTGTTCCCTGTTATTTGTTTGTGATATAA
 CAACAATCTTTGTTCTAGTGTGTGAGGGCCCTCCCTCTCTTTATCTGAGTGTGTATACCTTCTCTAATCTAATATGTAACAGGACTA
 ACTACTGAAACTTGTATGTAGGTGATGACCCCTTTGCTCTAGTGTACCTTCTCTAATCTAATATGTAACAGGACTTGTAAACAGGACTA
 TGTCAATGTACTCTCTTTGCAAGTGAATTTGCAATGGAAGCCAGTCTTATTAACCTTTGACAGGACTTGTGAAATGACTCAAT
 TCTATTGTGGTACCTCATGGCAGCTTAGCATTTGCAAGGAAATGCTTTGCAAGAAATATTAATTTCAAAACACATAATGAT
 AATGTTCCAAATATGCACTCTCCGCCAGTATAATCAGAAATGTTGAGAAACCATTTGGGAACTATACCTTTTTTATTTTTAT
 TTTTATTTTTTTTTTATTTTTTTTTTGGGGACGGAGTGTCTCCCTCTGTGTGCCCCGAGTGCAAATGGCTGATCTTTGGCTCA

```

CTGCAGCCTCCCGGGTCAAGTGAATCTCCCTGAGCTCCGAGTAGTGGGATTCAGGCATGCTCCACCATGCCCC
GCTAATTTGTAATTTTAGTAGAAGCGGGTTTCACCATATGGTCAGGCTGGTCTCGAACTCCAGRCCTCGAGTGANTCCGCCACC
TCGGCCTCCRAACTGCTGGGATACAGCGGTGACCCACCGCCCTGGCCAGGGACTATCTCTTTTAAAATAGACATTTGGGGG
CTCACAAATRAATAGTACCCTCTAATAAAGAGANAANAANAATCAGCGGTTCARACTTAGGCRACACTGCTTATTRAAG
CATAGTTATTTCCACTAGAAAAATTAATCAAGGACTATACATACTTCTACTAGGAGTCTTTTTAAAATGACACTTAAA
ACAACTAGTGAJAACCTTGAATCCACANCAACCCTGTTTATTTCCCTTAAACAICITGGAGCCTAAGCTTCTGAGPATCATGTGCA
AGTGTGATGGCCAGTAAAATACCAGAGAGATGTTTAGTACCAATTAAGGCTGTTTGCACCTTTAAGGACCAGCTGGGCTGTAGTG
ATTCTGGGGCCAGATGGCANTATGTTTACAAAATAATGCAATATGTCACATGTCACATGTTTGCATGTTTGGTCTGTAATTTTG
AACAGCAGTTGACCAAATCATAAGAAATTAATCTTCTTTCTATGGTTTTGGTTCACCTGCTAAGAGGTTTCTCAGAAATCTA
TGGCCACAGCAGCTACCAGTTCCATCCTAATAGGAAATPAATTTTGTACTACTGATACAGAACTCTGGGTCACATGAAA
AAAATCAATTTATCCCTCTTTTANGTATATGTTTAAAATPAATTAATTAATGCTGTCATATGTCAGAACAGCTCTGAGAGCACAGT
TTCCCAATACCBAATTCGATAGCAATANAAGTATTATTTATATGCTCAGTATAFTATTATTAATTTTTAGGTAATGCCCCA
CTCTTGGCTATTAAAGGAAGCAATCAGTAGGAATTCAGGATAGTTTGTTTAATCTTCCAGATTCACATGTTTTACAGT
GGCCTGCTATTGAGGAAGGTATTCCTATACACTTGTPTTAACTTTAGAACRTTGACGAARITGACGAARITATGCRATGGTTTTGG
ATACGGACTTGATGGTCIGTTTAACTAGTTGCTTCCAAAGTGGCCCTACTCAAGAGGCCCTAAGACTGGTAGAATAAAGGATT
TCAAAACTTTCTAATTCCTTTTAAACCTAC CAGCAACTAGGATTCGTAGCAATGAAATGATATGTAAGAAAGTTTTGACCAA
ATTGTTTTTTTGTGTTGTTGTTTTGAAATTTGAAATCATACTTATCCCTTAAAGAAATGTTAATGATGAGTGTGAGATGCT
AGCGAACCATTGCTCAGATATTCATCGTAACTCCCTTCACTGTTACAGATTTTCAAGCTGGTCACTGATAGTATGATTTCTTT
AGTAGAATGTGTTAAAATTAACAATGATCTTTTAAAANGATGAGTCTGATTTATTTATTTGCTGTGCTGGTCTAAGTGGAGC
CAATTAACAAGTTCATATGTAATTTTCCAGTGTGAAATCTCACACTGACTTCTGAAAATTTCTCCATCTCGAATTAACGAAT
AGTAGAGCCATATATTTGCTTCTTCCCTTGGATTTCACTACTTAAANGTTGTTAAATTTGTTAAATCTGTGAA
AGAAATAAAGTGGATTTAAATTAANAANAANAANAANAANA

```

SEQIDNO.:19
 ACCCTGGTCTGEGAGCCCTCCGACCCGTTTGGCTCGCGAGCCGGTAGTCCAGTCCAGGGCCCGAGTGTGGCTGCG
 TCGCCCGGGCTGGCGGCTCAGGTGTCCGAAGCTCTGTGATGTCATGATCCGGCAGGAGCGCTCCACATCTTACCAGGAG
 CTGAGTAGGAGTGTGTCAGGTTGAGAGCTCAGGC TGGCAGACAGCAGCAGCAGGAGCGGTCAAGTCCAGGTCAGGCT
 ATCTTACAGGCTCGACAGGTCGGCTCCAGCAGCATCCGCTTCCAGCAGGCTCCCTGAGAACGCTTCCCGGTCTACTC
 ATCTTACTTACTGCTCAGGCTGCGGCTTCCGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 GTCATGCTGTGCTTACAGGAGTGTGATGCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 AAGCAATTACAGGTCATCTCTCTGACAGCCCTGCGCAGGCTGACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 GACCCCTTCCRAATCAGACTGTAAATCTGCCCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 ITCCGCTGAAACAGAGTAGTGGACTTCCGCGCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 AGGTAGGCTCATGCGGCTGTGAGAGTCCCTGTTCAGCTGGAAGTCTCTGCGGCTTCCGACCTGGTCTAGATGCTC
 GTAAGACCAAGGAGGATGGCGGAGCAGTGGAGTTCGGCAGGAGCAAGTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 GCCAAAAGAGTCTCAATGTTTGTGCTTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 CCTTGGACACAATGCTCTCTGCTGGCCCTTCTTGGCATTAATTAAGCAGCAGAGTTTCCCAAACGATGATGATGAT
 ATCAAATTAGAAGAGACTTAAAGAGAGTTCAGGACAGGACCAAPRAGTGAAGTCCAGTCCGCTGATGATGATGAT
 TCCACATCAATGGGAGCTTCATCCTTCCACTTGTAAACGGAGTATCAACATCTGACTCATTGAAGAAATGGGCTTGC
 TGGAGGACAGCATGTAAACTGGAACTTAACTTAAATTAATAAATTTTAAAGAGCTGGCCAAATGATGATGATGATG
 CCTACAACTTAAATTAATAATTAATAAATTTTAAAGAGCTGGCCAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 TTCTTCTGTTG
 AAAGAGTGTGATTTCTTTCCAAAATTCCTGAGTATCAGACTGAGGTCATGCTTTGGAGCTTATGCACTGTACACAA
 CAAAACCTATGACTTGGCATCATCTGCCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 AGGCTACTAGAAACTAGTAAATTAAGTTTCTTAAAGGACTGAGTAGCCACTTCTGATGATGATGATGATGATGATG
 TAGATTAACTCAAPAGCCTAGGACAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 AAGTTAATPACAAAAGGAAAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 CAAAAGGTTGATG
 ATGCCAATG
 CCAATCATAGAGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 AAGTCTATTTTCAATTAAGTTTCAAAAATGTTTCCAGAGTTTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
 GCATTTCTAAATTTGTAATCTGGCTCCGATTAATCCAAAGGAAATRACTCAATGATGATGATGATGATGATGAT
 TGTTTTGATG

SEQIDNO.:66
 MIRQERSTSYQELSEELVQVES
 SELADQDKETVRVQSGILPGL
 DSESASSIRFSKACLKRVFSL
 LIFYLILLMAVAVFLVVRTITDF
 REKLKHPVMSVSYKEVDRYDAPG
 LALYFGQAQLLSCKHHEVIZPFL
 TSPGQPGDNMCTTORLNYITDFFS
 NQTVKSAALIVQGPREVKKRELIV
 LQFRLNKSEDFSAIDYLLPSSF
 QEFLQSPNRVGFHQACESACSSW
 KESGGFRTWVKMSLVKTKBEDGR
 EAVEFRQRTSVWVYIDQRPRAKK
 SAQLFFVVEWDXDFIQRVQDIV
 TANPWNTIALLOGAFALFLKAAE
 FAKLSINWMIKIRKRYLKRGOA
 TSHIS

<p>SEQIDNO.: 67</p> <p>MFRKGRKRRSSSSSSQSSSEISTKKS KSVDSLSLGLSRSSSTVASLDPDS TKSSGQSNNSDTCBFRIKYVG AIEKLKLSGKGLGEPDLILINYI DVAQDDGKLPFVPEEFIMGVS KYGLKIVSTSDQYDLHRHALXLI IRMVCYDDGLGAGKSLALAKTDD ASNEYSLMVYQCNSLEQQAIC KYLSLTAFDVSVLTSEKP</p>	<p>SEQIDNO.: 68</p> <p>MARYEVSYSGFEEFHRAVEQHN GKTIFAFTGSKDAGKSNCFDC VOAEFVUREGLKHISEGCVFYIC QVCEKPYWKDFRNDFRKMLVTA VPTLLKYCTPQKLVSESECLQANL VENMLFSED</p>
<p>SEQIDNO.: 20</p> <p>CGGACGTGGCCAGGCGTGGAAAAGCCGGCGCTGSGAGCGGGAACGGGNGTAGCTGCCTGGCCCAAAGGCCGGCCACTTCCCA CGGGAACCCGAGTCGGCAACCCGGGATGGCCCGGCTGCGAGGAGATCTTCTGGATCAAGCAATGGTGTGTAARATGTT TCGAAGGGCAAAACRCACAGTAGTAGCTCCAAAGTAGCAGAAATCAGTACTAAGAGCAAGTCTGTGGATCTAGCCTTGG GGGTCTTCCAGCTCCAGCACTGTGSCCAGCTCGACACAGATTCCACAAAAGCTCAGGACAAAGCAARCAATAATTCAGATACCTG TGCAGAAATTCGAATAAATATGTTGGTCCATTTAGAAACTGAAACTCTCCGAGGAAGGCCCTGAAGGCCCATFAGACCTGAT AAATATATAGACGTTGCCAGCAAGATGGAAATGGCTTGTCTCCCGAGGAGAAATTTATATGGGAGTTCCRAGTATGG CATAAAGTATCAACNTCAGATCAATATGATGTTTGCACAGGCAATGCTCTACTTAATANTCCGGATGGTGTGTACGATGACCGG TCTGGGGCGGGAAGACCTTACTGGCTGTGAGACCAAGATGCAAGCAAGTAGGAATACAGCTGTGGSTTTATCAGTGCARACAG CCTGGAAACAGCAAGCCATTTGCGAGGTTTATCCACCGCTTTGACTCTGATTAACATCTGAGAAACCCTEAAATCTGCAATC AAGTAGAGTCACTTCACTGAAAGTTCAGCTGTTTCAAACTGCAATGCTGAAATGTTATGCHAAATATGAGTTATCCCTTGCT CTAGATTTCTGAGAAATGGATTTGTAATGCTGATCATTTGTTTATTAATAATGTTCTTATTACACAGTGAATTAAGTCTCA ATGAGTCATCTATTTCTGGCTAATAAATCACTTATTTCAACTTCTAATAAGCTTAACTTAAGTGTCCAGAGACGAGA TGTACAGAGTCCACTCAGTGACAACACACACCTGAGGCGCTGAGGAGAACCTGAGGACATGGCTCAGTGGTGGCTTCCCACTCA TGGTATCACTGGCATGACCTCTGTCGCGAGAGGTGTGGAATGAGACCCAGGATCACTGCTGCTGTGMAACAATGACNTTGCCAAC TTAGACACACAAAGCAGATTTTCAGAAAGTGTGTCAGATAAACATGCTGGCCACCAACATTCCTGAGTTAAGAGAACCTTAA ANGATTACCCTCACTGCTRAAAGTATGTAAGATCCCATGTACAGTATGATGTTACTTTTTTAAAGGACTGTCAATATACAAA CTTTAAAGATTAARACATTAANAATAAAAA</p>	<p>SEQIDNO.: 21</p> <p>CCTCGCCCGCTAGCGGGAAACCCAACCGCGCGACCGGCGGTGTCCTCCAGTAGCGGCTGCACTGCGTGCCTGCAATGGCCGCTA TGAGGAGTGAAGCGTGTCCGGCTTCBAGGAGTTCACCGGGCTGTGACAGCAATGSCAAGACCAATTTTCGCCCTACTTTACCGGG TTCTAAGGACCGCGGGGAAAGCTGTGCCCCGACTGCGTGCAGGCTGAACCCAGTGTACGAGAGGGCTGAAGCACATTAAGTGA AGGATGTGTTTCACTACTGCCAAGTAGGAGAAAGCCCTTATTTGGAAGATCBAATAATGACTTCAGAAAACCTTGAAGTAAAC AGCAGTCCCTACACTTAAAGTATGGAAACCTCABAACCTGATAGTGTCTGATTTGTTCTAGTATCAATAAATGTTGTTT CTTGAAATTAAGATTTAGGATGGCAATCATGTCTTGATGTCCTGATTTGTTCTAGTATCAATAAATGTTGTTGTTGTTGTTG TCATGTTAGCAATAAATGATGTTAATAAATGTCATGTCCTAACAATAGAGTCTATAAATGCCCCATGACCTTTAGTTTGG CTGTAATACATGGATATTTAAGATTAAPAGHAGTCTTCAGAAATAGCAGTAAAGGCTCAAGAGAACCTGATCTTGAAGGTGACG GTAATACCTAANAACCTCCTAAGGTTGCGAGAG</p>

SEQIDNO : 69

MNSSKSEFTQCTERGCFFSSQMFLL
WTVAGIPILELSACFIITRCVVVTF
RIFOTCDEKKFQLPENFTLSCY
NYGGSVKMCCFLNWEYFQSSCY
FFSTDLISWALSINKNSRPMGAHL
VVINSQEQEFLSYKKPKWREFF
IGLSDQVVEGQMWVDGTPLTIKS
LSFMDVGEPPNLATLEECATMRD
SSNFRQNMNDVTCFNLNFRICEM
VGINPIKSKSL

SEQIDNO : 22

TCGGAGCTGACTTCCTAAGACAAAAGTGTTTTATCTTTCAAGATTTCATVTCCTCCGAATCTTACCAACAACACTCTCYGAGGGAGA
AAGAAAGAGGGGAGAGGAGAAAGAGAGAGAGAGAGAAACAAAACCAAGAGAGAGAAAATGAATCACTATAAACAACACTCAACTGA
AACACAAATGCACAGAGAGAGAGTCTCTCTCCCAAATGTTCTATGGACTGTTGCTGGATCCCACTCCTAATCTATTTCTCAGTGCCCTG
TTTCATCRCCAGATGCTTGTGACATTTGGCATTTCCAAACCTGTGAGAGAAAAGTTTCAGACTACCTGAGAAATTTCCACAGAGCTI
CTCTGCTACAAATTATGGATCAGGTTCAAGTCAAGAAATTTGTCCANTTGAACCTGGGAATAATTTCAATCCAGCTGCTACTTCTTTTC
TACTGACACCAATTTCTGGCGTTAAGTTAAAGAACTGTCCAGCCATGGGGCTCACCTGGGTTTATCAACTCACCAGGTCAGTGGCAATGGGT
GGAATCTCTCTACAGAAACCTAAAATGAGAGAGTTTATTGACTGTCCAGACCAGTTCAGAGTTGTCGAGGTCAGTGGCAATGGGT
GGAGGACACCTTTGACAAAAGTCTCTGAGCTTCTGGGATGAGGGGAGCCCAACAACAATAGACTACCTGAGGACTGCTGCCCCACCAT
GAGAGACTCTTCAAACCCAGGCAAAATGGRAATGATGTRACCTGTTTCCAAATTAATTTCCGAATTTGCGAATGTGAPARTGGTAGGAATARA
TCTTTGAAACAAAGGAAATCTCTTAAGAACAGAGCCAACTCAATGTGTAAGAGAGGAGAAAGCAATGATAAATAAATAAAGTAGTTT
CCGCCCCACAGGAATAATTTGCGCTGAACTTCAAAGGACTTCAATAGTAATTTGTAATCTGATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AAATGTTAATAATCAAGTACTGGCTGAGTGGCAATTTCTCTACSTTAGTCTCAGGTCCTCTCCCAAGATTTACAAGCARPTC
ATACTTTGCTACATTTGCTCAATTTGCTCAATTTTAGTTGTTGTAAGAGAGAGGACACCCGAGCCAGAGACTCTAGCAAAAGAGGG
GATTTGGAAGGTCCTTCAAAATCTCTGAAATCCGGCTTGAGGAGTCTCTTTCTGACTTCTGACAAAGTCTGCTTCC
TCVTCTGTTTCATACCTTCCTATCTCCCTGCCCAGCATATATCTCTACTCCCTGTATATGAGTAGAAGCTTCTTCA
AGTCATGAAACTTAATTCCTGCTCAGAAATACCGGTGGCTTTCTGCTACAGCCCTCCACCTGCTTAGSAAAGGGGCAATCC
AGCCATCAGCTCAACAGGCTGTAAACCAAGTCCACCACTGCTGGGCTTCCAAATAGTCAATTAATCTAAGCGAATTAATCACTGACTGAATGGA
CTGTCTCAGGCCATCCATTAATTTCTAACTTTAATTTAGCTTTGCGGGGTACRGTGTAAAGGCTTTTATATAGSTRAACTCAIG
TCGTGGAGTTTGTGTACAGATTATTCATCACCAGGATTAAGCCAGTGCCTAATGTTGTTTTTGTGCTCCTCCTCCTCCT
CCTACCTTCCGCCCTCAGTAGACTCCAGTGTGTGTTTCTTTGTTGTAAGAAATCTCATACTTAGCTCCCACCTTATAA
GTCAGGACATGAGTATTTGTTTTGTTCCCAAGTGTAGGAATGGTTTCCAGTTCTACCGAATGTCCCAAAAGACAT
AAATTTCTTTTAAAGCTGCTAGATTCCAAFGGATCTAGTATCACATTTCTCATCCAACTAATGTGTGACTCACATTTAGA
TTGAATCCAAATGTTTTGCTAATGTAATAGTGTGCAATGAAACATCTGTGTGCAATGTTCTTATGTAGTAAGAAATTTAATATTCTC
TGASTATGATCCAGTAAATGGCCCATTCATTTAATGCATAAATTTCTACCAATC

SEQIDNO.: 70

MAQPI LGHSLQ PASAAGLASLE
LDSLDQIVQIRIFKLIIVIGDSN
VGKTLATFRFCGGTFPDKTEATI
GVDFRKTVIEIGEKIKVQVWDT
AGQERFRKSMVEHYRYNVHAVVF
VYDVTQMTSFINLKMWIOECNGH
AVPFLVPKLVGNKCDLREQIQV
PSNLALKFADAHNMILLFETSAKD
PKESQNVESI FMC LACRLKRAKS
LLYRDAERQQQKVQKLEFFQBAN
SKTSCPC

SEQIDNO.: 23

CTTCCTCCCTCTTTTGTGGTGGCTCCGAGCTGCAAGGAGGTGGCTGGAGGAGGAGGGGGGGCCCGAGTGAGAGGC
ACCCCTTCACGGCGGGCGGCACACGGTGGCGGCACACACACGGGGGACACACACACCGCGCACACACACACACAC
GAGCTCGCTCGCCTCGAGCGCACGAACTGGACGTTCTCTTTGTGTGGAGCCCTCAAGGGGGTTGGGCCCCGGTTCGGTCCGGG
GAGATGGCGCAGCCCATCTGGCCATGGGAGCTTCAGCCCGCCCTGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGAGCTCAGCTCGCTCGCTG
GACCAAGTACGTGCAGATTGCACTTCAAANTAACTGTTGATGGGACTCCACGTTGGGCAAGACTGGCTTCCGCTTCIGC
GGGGGTACTTCCAGACAGACTGAAGCCACCATCGGCTGGACTTCAGGAGAGAGACCCGTTGAAATCGAGGGGAGAGATCAAG
GTTCAAGGTGTGGGACACAGCAGGTCCAGAACGTTTCGCAAAAGCATGGTGGAGCAATTAACCGCAAGTACATGCCGTGGTCTTC
GCTTATGACGTCCACCAAGATGACATCTTCCACCACTCAAAAATGTTGATCCAGATGCCAATGCGGCAAGTCTGTGCCCCACTAGTC
CCCCAAGTGTGTTGGCAACAAGTGTGACTTGGAGGAAACAGATCCAGGTGCCCTCCACTTAGCCCTGAAATTTGCTGATGCCAC
AACTGTCTTGTGGACATCGGCCAAGCCCAAGAGAGCCAGAACGTTGGAGTCGATTTTCAATGCTGGCTGGCTGGCCGATG
AAGGCCCGAAATCCCTGCTGTATCCGTATGCTGAGAGCCAGGAGGTGCAGAACTGGAGTCCCACAGGAAGCTAACAGT
AAAACTTCTGTCTGTGTGAACCAACGATATRAAFACAAATRAATATCACTGGAGTTTTTCTTCCCTTTTTTCTGTGCT
GCATPAATGCTGACACCTGTTTTCATACAAATTCATATCAAAATTAATAATTTGTATAGATTAATAAAAAAATAAAAA

16

SEQIDNO : 71

MEDGVAGPOLGAAARERERAEAR
 ARFGVTLRFPFLSRAABADEGG
 GDWSFDCEMEVDLQDLPSATI
 ACHLDRFVFDGLCRANFESLFR
 TYDKDITFQFKSFRKRVINFN
 PFSADARLQHLHKTEFLGKEMKL
 YFAQLHIGSSHLAPENPKQFL
 ISPASFPVQWQVEDATPVINY
 DLLYAIISKLPGKYEKVELHAAVDT
 TFSVVVHVCESDQEKEESENER
 MRRPKFKLIQTRRPEYTP IHLS

SEQIDNO : 24

GGAGCGGTAGGCTCGGGGCAAGCCCGGAGCGCCCGCTGGGGGCGACAGGGTCCGGGGCGCGGGGATGAGGACGGCCTG
 GCCCGTCCCGAGCTCGGGGCGGGAGGCGGGGCGGAGGGCGAGCGCGGCCCGGGTGACGCTCGGCCCTTCGCG
 CCCCCTCGGGGCGGCGGAGCGGAGCGGGCGGGGACTGGAGCTTCATTTGACTTCGAGATGGAGGAGTGACTCGAGGAC
 CTCGCCAGCGCCCATCGCTGTTCACCTGGACCCGGCTGTTCGTGAGCCGCTGTGCGCGGCGCAAATTTGAGTCCCTCTTTAGG
 ACGTATGACRAGGACATCACCTTTCCAGTATTTTAGAGCTTCAAACAGAGTCAGATAAATTCAGCAACCCCTTCGCGCAGCAGAT
 GCCAGGCTCCAGCTGCATAGACTEAGTTTCGGGAAGAAAGAAATTAATTTGCTCAGACTTTCACATAGGAAGCTCACAC
 CTGGCTCCGCCAATCCASACAAGCAGTTTTCTGATCTCCCTCCCGCTCCCGCAGTGGATGGAACACTGCGCGGACTGACACC
 CACACTHAACHTANGATCTTTATGACATTCAGAGTGCATCCAGAGTGGGCGGAGGAAAGAGAAATGGAAAGAAATGAGGAGACC
 ATATCCAGACCGGAGCGGAGTACACCCGATCCACTCCAGCTGGGCGGAGGAAAGAGAAATGGAAAGAAATGAGGAGACC
 GAGGAGGACTTTTACTGAGGAGGCTGTGCACGACTTCTCGGAGGTGGCAGCCGAGATCGGGTGGCAGAAATCCCAATCTAC
 GTGCTCAGAAGAGAAATCAGGCGGCTGCTCCCTGTTCTAATGCTGACACCTGCTGAGAAACAGATATGATAGTGTCTTCTCTT
 CAATCTGAGTTTGTGATCGACAAAGGACATTGGGACTGCTTGAAAGAAACAGATATGATAGTGTCTTCTCTTCTCTTCT
 TCTCTACTGAGAGGATACCAGGAGCAGGTTGATCAGTGCAGTGCAGAGGTTTGGAAACAGAGCAATGCATGAGGAAATGAG
 CGTTCCTTCTTCCCTCATGTTCTCATGTTTGTGCATGTATATTAAGTAGACTTACAGACTAATGATGATGATGATGATGATG
 GCAACAGCAGCTGCTCGGAACTTTCCTGGAATGCATTCAGTCCCAAGGTAACAGTATCAGCTTTCAGGTAATTCAGGAAAT
 AGAAGTTGATCGAAATTCCTGAGAAATTAGCTTATACATTCAGAAATGAGGATTTCTACTGCGGACTTCGAGTTCGAAAT
 ATTTTAGTTTTAGGTTTTGGATCGGACTCAGTTCTGTTTATGTTGTTTCTTATGAGTTTCTTATGATGATGATGATGATG
 TTTTTGGAAAGTGTGGATGATGTTGGTTTTTACTCCCAAGAGAGACTCAAGATACCTTGTAAATAGCTGATAGCTGATAG
 AATCATACCTGTGACACTGGGTGAAAGTAAGTGGCAGTGGAGACTAGATGTATTACCTACCTGGAATCATTATGTGATG
 AAGCTGTTCCCATGCTACAGGCTGAAATCAAAGCAGTGCAGTGGAGAGACTAGTGTAAATGTTAGTTAGTGTGATGATGATG
 CTTTCCCATTCATCCATGATGAAATGTTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 GGTATATATTTTTGGCCCTTACAAACCGTAAACAAATGTTGGCATTAATGCTTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 TTGGAAGATGGTTTTTATCTTTCAGAAAGCAATATGTTGGCATTAATGCTTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 CAAACCTGTTTACTCGGACTGGGTAAAGGAGCGGTTGAGAGGACTTGATGATGCTCCAGTGTTCCTTCTTGTAGTGTCTT
 TTAAGTGTCTT

SEQIDNO. : 25
 GATTCGAGCCAGGAGGAGCCGCGGTCCTCAGCAGCCGCTGCTGAGAGGCCGGTAGCGGCGGCTCCCGAGGGG
 CGGCGCCGCGCTCTCCCTGAGAACCGGGTCCCGCAGCTGGGCGAGCCGCGGCTGAGCCCTGAGCTGTACAGCCCT
 CAGGCTCTTACAGAGCGAGCCCAAGTGTGTCTCAAGCCGCAFCAGATGCTCTTCCTCAGCTTTTCCAGAACAGCAG
 CGTTCAGGAATTCATGACCTTCAAGCTCACTGATGTTGGGCGCTGATCCGAGGCACTAGAGTCTCTGTCAAGAACAGCATA
 TCTGTCCAGCTCTACGTCGCGAATGATAGTCTTGCAGGTGCTCATGCTGACRATGAATCCATCCCGGTGGCTTTACCTT
 CTTGGAGAGGCTACATGATATCTCCAGCAGTCCACAGATGATGCGAGTAGATCCCTGTCTACTAATCCATTTACCCAGC
 CTTGGATGGTCACTCAGTAGATACCAAGAACCCACAGAGCTGATCCCATGACTAAGTGCAGGCCGACTAGTAGAGCCAAAT
 CATCTGCACAAACCATGGAGTCTCTGTTAGCGAGGTGAGAGCTAGATGCTGTTGTTCCAAATCCGAGGTGCTGGGAACACA
 GTCTAAGCCCTTCTAATAACTGCCCGGAAACARAATCTATGCTGTGCATCAATGATGAGAGCCAGAGTGGGGCGAGACTGGCAA
 TGGCACCATCAITACATCAGAACTGCAGCCCTTGAAGAGAGAGAGACACCATAGACGAGGAGCCAGAGTGGGGCGAGACTGGCCA
 TTTTATTTGAGTTCCTGCGAGAAATGGATGTTGAAGGGTGGCAATGTTCAAAATCAATATGATGTTGTTGATGCTTTTGAAG
 AATTTGAGTCCCAAGGTTATTTTGGCARTATGAACCAFAACTCCGACTGGCTTCTGTAGATGCCAAAGGCTCTTTTCA
 GCTAACCTGGGAAGGCTCTGAGGAGGAGTCCGAGCCACTGTTCTCGATCTTTGGTATATCTTTGGATTTATTTGTACATT
 AATGATATTAACACTCAGTGGGGTGGAGTCCCTGATGCTAGGGCTGGGTTGGTGGAGTTTGAAGACTCTTTGGGAAGCCTC
 TCCGGGGCCACTGTTGGGGTGGAGTGAAGCCCAACAGAGGCCACAGCCGCCACTTCAAGCCCAAGGCCCTGGGGCGGG
 GGAACAGTCACTGGGCTCAGATTCGAGACTGTTGTTAGCTTACCTTCTGCTAGGATTTGGCTCCCGCAGAGGGCAGGCCCAT
 CCTAAGCCTTCCAGTCCCAAAAGTGGCTTGTGGAGGATTTTTCCTGGTGTGATGATGCTCAGCTGGGAGTGTCCAFCAI
 TGTACCCAGCAAGTAGACTAGGAAGTCCAGCCAGGAGGAGTGTTCCTGCTGATTTGGACACTTCCCTTGAACCTTGAACATCAGGA
 CAGGGAGATCAACACAGGTGCACTCAGTCCAGGCTTCCAGGAGGATTTTATTTGACTGTGGCTTGAACCTTGAACCCGCTGAGGCTAT
 TCAAGCAGCAGGTGCTGTGCTCTCAAAATTTGATTTTATTTGACTGTGGCTTGAACCCGAGGATCCAGACCCCTATATGGTCTT
 GCATCTGACAAAGTGGTCTCTCCCTTGAACACAGGATGGTTCAGAGGGGGAGCCAAAGGTTGGCTTAAGCTGTGCCCTTCCCA
 OCCAGCTAGCTTGTAGTCTCTGTTGTTGTCAGAGTTCAGAGGGGGAGCCCAAGAGATGGCCFAAAATGTTCTGGATCCCTTG
 CCTGCGAGGAGGCCACTCACTGCCCAAGTCAATGGCAGAGTGGAGCCAGCCCTGGGATCCAGACCCATGGAGCTTCTGCTGGATGG
 GGTCTTATGTTTGAATGAACTGCACTGCCCTCAGGCTCAGGATCCAGGCTGGCTGGAGCTTCCCTTGAACCTTGAACCTTGAAC
 TGTCACTATGGGTTTGAACAGTGTGATGTTCTTGGAGCTGCTGGGAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGC
 TGACCAGGCTCAGTGTCTTGAACCCCAATGTTGGCAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGC
 CTCCTGGCTGGTTTACTGCTGCTGCCATTTTCTCTGGGACTGCTGGCCTGGGACTTGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGC
 GTCATTTCCACTGCTATAGATACCTAAGCCCAAGGCTTGTGAGGCCAGACTCAGCTGCCCACTGGTCCCGGAGCCGAGTGT
 GAGTGGCTGGATCCAGGGATGCTACTCTCCCTTTCCACTTGGAGCCCTGGGGAGAGATGGGGCGGGGAAATGGAGGTAT
 GAATTTGGGTTAAGAGGATGAGATCCCGCTGAGTCCAGTCCAGCTTGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
 ATAGAGGGCCAGCCCAAGCCCAAGATCCCTGCTCCCTGTTGTTGTTCTGTTGTAATCATTTGGCGAGACTGTATTTTAGTA
 ACTGCTGCTACTTCCCTGTTCTTATTTGAGAGGCGCTGCTGGGATAGATGTTCTTGAATTTCAAAAATAAAAAA

SEQIDNO. : 72
 MKLYSLVLYKGEAKVLLKRAY
 DVSSPFFQSSVQEFMTTSQL
 IVERS SKGTRASVKSQDYLCRVY
 VRNDSLAVVVIADNTPSRVAF
 LLEVLDEFKQVDRIDWPVSSP
 ATIRYPALDGHLSRYQNPREADP
 MTKVQAEIDETKILHNTMESLL
 ERGEKLDLVS KSEVLGTSKRAF
 YKTARKQNSCCAIM

<p>ACGGCCCCGCTCCGTGCAGTGCTTGGACTACATAGTCCTTCCTCAGGGCGTGAAGGGGAGTGACCTCTAATCCACCCCGG CCGGCGCCCTCGTGTGGCCCGTCCCGTCTGACCTCGCCCGCGCTCCCTCCTCGCTCGGTTTCGGTTCAGCTCCCG CCTCCACCAGGTGGGCTGGGCCACAGGTCGATCCGCCGCGCGAGTGTACCAAAATATATTTCTGCAAAA GAAAAAAGTACCTTAAACCCAAAACATACATAATTTATATAGAAAAGTATTTTCTCCACACAGCAAAAGGAAAAAG AGAAGATTAACATTTGCACCGAATGTCTTGTTGGTGGACATAGGAAATACCAAGCAACRANGTTATATCCATCCATTTT TACTGAATTTTCTTCTATCTGTTCCACTGTCTGATTTCTCCATCTCATGTCATTTGGTGGAGTCGGGTAGG GGGTACTTGTCAAAGGACCATTTGGTGTGTTGCTGCTACTGTTCCATGAAAATATTTTATGATAATTRARAGAAAATC TTTTG</p>	<p>TRDAKGISQEQMNEFRASFNHFD RDSHTLGPPEFKACLISLVDI GNDPQGEARFARIMSIIVDPNRLG VVTFQAFIDFMSREFATDTADQ VMA5FKILAGDKNYITNDELRRR LPPDAEYCIARMAPYTTGPD5VP GALDYMSFSTALYGESDL</p>
<p>SEQIDNO.:27</p> <p>TGCGGCGAGGATCAGCCGCTGGACCCGGAGTCTCAGGGGGCGAGCCCGCTAGGCCCTCGCGGAGATGCCAGCTCGGT GCTTCTACTTGCGGCGGGCCGCTCCGGTCACTCCACTCCCTCCGCGCAGAGAGTATTTCTGGTGGTCCGATCTCAT ATGTCAGTTTTAGSAGGCTTGGACATTTGAACCTCAGAITCTGCAAGAGCTCTCTAGATCCTTTACAGAAAACCCAGCATAC TTTGCCCTCAAAGATGGATAAAGATGTTCTGGAGNTGAAATAAGAAAATCAGCAGTGGAGAGTAGTAAGAAATCAGGC TCTGGAAATCTGGAAAAGTGGAAACCGCTGCGCTCTTAAATGTTGGCGACTTGTCCACACATGTAGAGACCTTTGATATCC ACCCTTTTGTCAAGTGTAAAAGTGTCTCATATTTTGTGTCTGTCTGCTATCTGAAAGACTCAAAGAAAAGCAATTAAGAAACCT GAATCAGACGAGAGCTGTAATAATGGCAATCCCAAGAAACCAACCCTCCCTTAGAGATTTAATAACTACTCCCTGCACAGTAT GTTGTGGCCAGTCAATTTGCTAAGAGGTCTTTTCAGTTCGTTGTACATCATATATAAGAGATATATAATATCCCCAGTAA CTGACACGACGAGAGGTTGAGAAAGCAGCATCATTAACACCAGAGAGTTAGAAAAGAGAACGCGGAGGATGATACAGATT ACAAAATGCTTCAAGTGTGAAATTAGCCACATGTAAATGCTTAGGGCATCAATGCGCAACGGTAATCAACAATACCT CAGAAAACGAGGAGTGAATTTGGATTCTTCATGAIGACATATAACTTTGAAAAGATTAATTTTGTCTTGGACCACT GGGTCAAGTAAAACCTGCTGGCCACATCCCTAGCTAAATGCTTGATGCTCTTTGATCTGTGACTGTACAACTTTGACTCAG GCTGATNTGTAGGGGAGATATGTAACTGTGATTCGAAATCTCCAGATGCCAAATTAATAATGTTGAAAGAGAACACRACAAAGGA ATTTGCTTCTGGATGAGTAGAATAGATTTGGCAGTGTGCAGGCTTCATCATTCGGGATGAGTTGAGAGACAGTTCAAGTTGAT GGCTTATAAAACTACTAGAGGCACAATGTCAAATGTTCCAGAAAAGAAATCCCGAAAGCTCCGTGGGAACACAGTTCAAGTTGAT ACACARACTCTGTTTGGCCATCTGGTCTTCAATGGTITAGACAGAACTATCCAGGAGGAATAATGAAAGTAAATGAAAGTATCTTGG TTTGAAACCATCTPATCTGGAAAAGGCGAGAGGCTGCAGCTGTCCAGACCTTGTCTAATCGAAGTGGGAACTCGRATCTCAC CAGACATGAAAAGATCGGTTATTGCTCATGTTGGAGCCAGAGATCTGATGAGTTGGCTGATTTGCGATTCCTGATTTTGCGGA CGGTCCTGTTGGTTCCATTGCAATGCTAGTGTGAATAACACTTTGACAAATATTAAGTGCACCAGAAATGCTGTATTCTT CAGTACAGGCTTATCAGCATGAAAGTGTAACTGAACTGACTAGGATCTTTGAAAGCTATAGCCAGATGGCACTAGAA CGAAAACAGGTGCAGCGCTTCCGCTCAATAATGSAAGACTGTACTAGAACTATGTTGAACTCCATATTTGATATCGTATCGTA TGTGTGAGGTTGAARAAAGTAGAAGGAAAAGGAAACCAGGATCATCTCGGGCTCCACAAAGAAATCTCTGARGAGGAG</p>	<p>SEQIDNO.:74</p> <p>MFSCGACTCGAAAARLNTSSLAS AORGI5GGRIHMSVTLGRLTFTFET QILLQAPLRSFTETPAYFASKDG ISKDGSGDNKKASASESSKKSQ SGN5KGNQLRCPKCGDLCTHV ETFVSSITRFVKCKXCHHFFVVL5 EADSK5I1KEPESAAEAVKLAF QQKPEPPPKIYNTLDDKIVVQOS FAKKVL5VAVYHYKRIYNNIPA NLRQA5EVEKQTSLTPRELEIRR REDEYRFTKLQIAGISPHGNAL GASMQOQVNQIPEKRGGEVLD SSHDDI1KLEKSNLLELGGTSSGK TLLAQTLAKCLDVFPFACDCTLL TQAGYV6BDIESVLAKLLODANY NVEKAQOCIVFLD5VDKIGSVFG IHQLRDV5GEGVQCQGLLKLLEGT IVNVPEKN5RKLRG5ETVQVDYTN ILFV5AGAFNGLDRIISREKVEK YLFGFT5N1GKGRRAA5AADLA NRS5G5NTHQDIE5KDRLLARHV ARDLIE5GMI5PE5VGR5LPV5VPL</p>

SEQIDNO.: 77

MLRLQMTDGHISCTAVEFSYMSK
 ISLNTPPGYXVKLSGIVDIKMGF
 LLNDSNTTVLGGVEHLIERWE
 LQRLSLKHNSNIQTGGPPFV
 PFGQKCVSHVQVDSRELDKRTL
 QVTFPKFTINDDEFEKORTAL
 REVAKSKETKTFGGGGGARSNL
 NMAAGNRNREVLQREKSTZSEG
 KHEGVYRELVDKALKKHIITEMGF
 SKEASROALMDNGNMLEAALNVL
 LITENKQKPYMGPPDLRGRGXGGR
 IRSEDEEDLGNARPSAPSTLDF
 LESKMGILNVEFPKSOPOQLHQG
 QYRSNTEQNGVDNNHLRHPER
 NDRQPRNEKPPRFORDSQNSKS
 VLESGLEPRNRCSEPSSTSSYSE
 VWAEDRIKDRPYRYDRTRDTS
 YPLGSQHSDEAFKREDNSMGRS
 GKGFSAENKENPLPQGSVDYMN
 OKFGKRESQTSIPDYFYDRKSQT
 INWEAFSGYKIEKHEWVNTDYQ
 PVRSNSFIGVPNGEVEVEMPLKGR
 IGFIPKPGVTVAVPCDDKIFPNS
 GPKRSGPIKPEKILESSIPMEY
 AKMWKPGDECFALYWEDNKFYRA
 EVELHSSGNTAVVFEIDYGNYE
 EVLLSNIKPIQTEAWEEEGTYDQ
 TLEFRGGDQPRKSTRPTQGFY
 QFFPRARN

SEQIDNO.: 30

GRACCTCCGGCACTTCCAGGATCTTTCAGNYGAGGCATTGAAGCTTGCCACANGCTTCCRAGACAAAGTCATGTAATGAC
 ATCATCTGANTCTCAATATCTGAGAACAAATGGCRAGAAATCC7CCACGTGACACAAATGATGGAAAGGTAGAAAAGCTCG
 AAGTCCATGTGTTGGCAAAATTCAPAAAATTCGCAAGTTCGCAACAAAGATATGAGRATCTCAGCTGCCAACCAAGATGC
 TGCGATPACAGNACTGATGCTCATATATGTTACAGCAGTAGATTTAGTTATATGTCARAAATPAGCCTGAAACACACCCACTG
 GAICTAPAGTTAAGCTCTAGCCTGAGCCTGTTGACATAAARANRGNATCTCTGCTCTTGAATGACTTAAACACCACTGTTGGTGTG
 AAGTGAACACCTTATAGAAATGGAGTACAGAGACTTATCAAAACACATAGAACAAATGGAACTGAACTGAAAGTGGACCCAC
 CGCCTTTGTGCTTTTGGACRAGTGTATCTCATGTCCRAGTGGATGATGAGACTTGTGAGAGTGCARAGAAAACATGCAAGTTA
 CAATGCTGTCAAACCTACAAATGATATGATGANTTGNRAAGCAAGAAAGGCTGCTGTRACCGRATGGGAATTTTACAGA
 CCAAGCAATTTGGAGGTTGGTGTGCTAGRATATCTCAATATGAAATGCTGTTGATGAGAAAGCTCTCAAGCACATAACCGAAA
 AAGRAAGTCAACCAATCAGAGGGAACCAAGAGGTGCTATAGNGRACCTGTTGATGAGAAAGCTCTCAAGCACATAACCGAAA
 TGGGCTTCAGTNRGGAAGCATCGRGGCAAGCTTATGGAATATGGCAACACTTAGAACGACACTGACCTTACARGCA
 ATRAACAGAAACCTGTTATGGGTCCTCTGAGAGGTAGAGSRAAAGSCAGGGGCGAATPARGACTTGAAGATGAGAGGACCTGG
 AGCCACAGCAGCTTCATCRGGGACRAAPACGATCAICAAATACAGCAAAATGGAGTAAATGGAATGGAATGGAAGAACTTAATCAC
 GAATCAAGGCCATCAGCACCAAGCAATTAATTTGATTTCTTGGRAITCAAATGGGAACTTGAATGGAAGAACTTAATCAATGGA
 CTCGAAATGATACAGGCRGCCAGAAATGAAAACCCCTGCTTCARAGAGACTCCCAAAATCAAACTCAAGTCACTTGTAGAGCA
 GTGGATACCTAGAAATAGAGTTCTGANAACCRAGTACTCTTCAATCTGAGTACTGAGTGGCTGAGACAGCAATCAAATGGAATA
 GACCTTATCTAGATATGACAGAACTAAGATCTCATATCTTTAGCTTCTCAGCTAGTGTGGTCTTTTAAAAAAGAGNATA
 ACTATGCAAGCAGTCCAGAAAGGTCCTTCTGCRAGSCAAAGAAATCCACTTCCCAAGGATCTGATGATTAATA
 ATCAAAPACGTGGAAAAGAGAGCCAAACHCTATCTCTGACTATTTTATGACAGAAATCAGTTCGAGTAAATAGTTTCAATGGTTC
 TCAGTGTNAAAATYGAALACATTTAATGTAATACCTAATGAGCCAAATAGCCAAATAGCCAGTGTATGATGATGATGATG
 ATGGAGAGTAGAAATGCCACTGAPAGGAGACGAAATAGCCAAATAGCCAAATAGCCAGTGTATGATGATGATGATGATGATG
 AAATATTTTACANTAGTGGCCCAAACGAGATCTGGCCAAATAGCCAAATAGCCAAATAGCCAGTGTATGATGATGATGATGATG
 CAARAATGGAACCTGGAGTGAATGTTTACCTGACTGCGAAATAGAGAGGTTGCTACTGAGCAATTCRAGCCCATTCRAACAG
 CTTGCGGTATGACAGCAGTTCCTAATTCATGACTAGCGAAATAGAGAGGTTGCTACTGAGCAATTCRAGCCCATTCRAACAG
 AGGCATGGGAGGAGAGGCACTACGATCAAACTCTGGAGTTCGTTAGGAGGAGTGTAGTCCAGCCRAGAGATCCACTCGGCCAA
 CTRACAGTTTTACCAACCCCGCTCGGAACATAAGGAAAGACTCTTGTGAAGAACCAGCCAGTACGAAACACACCTG
 GTGAAACCTGTTGACAGCCTTCCACTTCTTCAAGATAAGTAGTGTGGTGGATATTAATTTGAGAAAGAAACACAGAT
 TTAGGGTGGHAAAACAGTCAACTCACACRAGAAATGGAAAATAATCTGATTAATTAAGCHAAATACCTTTTACAGTAGG
 AAGNATTTTCTTCCCTGCTCAATAAAACCAATGTGCTATTAATTTTAAAATAAAAATAAAA

SEQIDNO.:31 ATAAATAYCAGAGTGTCTGCTTGCTTGCTTGCTGGAGCTCCAGAGTAAAGCAAGAGAGAGAGAGGAGCCGCTGGAGTGCTGGAGTGTGT GACACCCGACCAATGTGGABAGCCTGGGGCTTGCCCTGCTCTCCTCCTCCATCGGAGGAACAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CTCCATATGAGCAACCCGAGCCCTGGAGCAATAGGAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG TCTTCAGCCAGTGTATACTGTGTGTACTGT TATTTCTTATATGTGTGTATACTCATCAGAAATCTT TGTTTATCAACAAGAGAGAAACCAACAGAGAGGCTGGACTT CCGTCTTGTATATCATCTCTCAGGACTCTCAAGAGTGAAGACTTTTGTAGAGACTTTTGTAGAGAGCCATTAAGGATGCTTACTGTGAGTAAACAAGTGA GAAATGTGGAACTGCTCTCTCAGGACTCTCAAGAGTGAAGACTTTTGTAGAGACTTTTGTAGAGAGCCATTAAGGATGCTTACTGTGAGTAAACAAGTGA AACTCCATCGCCTCATTTACCATCTGTAGCCATCAFCACAAATCTGTGACATCAGCCCTTGGCAGCAGTGTAGCTTGGAGAGTAAACAAGTGA ACCAGGAGCACCAATGTCTCTACTCTATCT CCCAGAACCCGAGATGCCAGCAAGTGAAGATTAACAGANTTAACAAGAGGCTTCTGTGACACTGTATATTTGAARNAACAAGAGGCTTCTGTG CTGTRAAATGGCCACAGATTCAGAGTGTGGCTCTCTAGGAGTGTGCTGTCTGAGATCTGTGACACTGTATATTTGAARNAACAAGAGGCTTCTGTG AATCACTGCAGTGTAAAGAAAACCTCCATCTTATTAGTAGGAGTGTGCTGTGAGATCTGTGACACTGTATATTTGAARNAACAAGAGGCTTCTGTG GTGACGTTGCTCCAGTCTGCAGCAAAATAGTCAAGGCTTATAACCCACAGAGCCAGTGTGACACTGTATATTTGAARNAACAAGAGGCTTCTGTG AAAAAAGTGAAGTGAAGTCTCAACTAAATATTAAATAGGAGTCTATCTCCCAATTAACTGTAGACACAAATTTCAATTTCCAGCAT TTTATAACTCCAAATTAGTGAACCAAAATAGAAATTAAGATTTGTCGAAGACTGTGACACTGTATATTTGAARNAACAAGAGGCTTCTGTG AAATTTATGCATAGAAATATTGACTCAAGCCATATTTTGTATGATGAGAACGTAACCTATATGACTATGACTATGACTATGACTATGACTATGACTATG CTTTTTTTTTCTTTTCCAGTTCCTATTTGCTTTRATGAGATAGAAACCTAACTATGACTATGACTATGACTATGACTATGACTATGACTATGACTATG CAGTTRAGAAAGGAGAGACAACAAGACATGCTTTCCATTTTTTTCTTTTACTTACTTCAAAACAATATACTTTGCTCTTTCT AATCTTACTTTTTACTTATPAPAPATAGTGGATTTTGTATATCTTAGACTCATCTCTGATTTTTACTATCACACATGATAAGCCTTT CATATAAATCTTAAATACTTAAATCTTTGATATCTTAAACTTGAGTGGCTTCTTAAAGTATAAGGGGAGAAAGATATAATTTGTC GFACTTCTTCTTAATGTGTATCACTTCTTAACTTGAAGTGGTGTAAAGTATAAGGGGAGAAAGATATAATTTGTC TGTCTCATATTTGCTTGTATATTTTCTTCTTCAATAGTCAATGTTGTTTAAATAGTAAACCAACCTTAAACCTTAAACCTTAAACCTTAAACCTTAA TPAATCTATTAAGCAAGATGCAGTACAGAAATTGGATACAGTACGGATTTGTCCTCAATAAATTTCAATAAACCCTTAAACCTTAAACCTTAAACCT AAA	SEQIDNO.:78 MWRSLGALALCLLPSSGGTESQD QSSLCKQPPAWRSIRDQDPMNSN GSVTVVALLOASUYLCILQASXL EDLRVKLKEGYSNISYIVVHQ GISSRLXYTHLKNKUSEHIPVYQ OEENQDVTWTLILNGSKDDFLIYD RCGRLVYHLGLFPFFLTPYVEE AIKLAYCEKKGKNCSSLTLLKDBD FCRRVSLATVDKTVETPPSPHYHH EHHNHGQHLGSSSELSENQRFQ APNAPTHPAPEGLHHHKKGQH ROQHPENRDHPASEDLQDLQKLL CRKCLINOLLCKLPDSLAPRS UCCHCRHLIFEKGTGSAITUQCKE NLPSLCSUGGLRAEENITTESCQJ RLPFAAUQIISQQLIPTSASUR UKNOAKKUEUPSN
---	--

GGCTGTGGTACTCACCCTCCAGGTGACTTTAGGCTGTGGGGTGGGCAATTTAGTGGTACCCCTTCACCCAGGGTTTTC
TAACAGATGACCTGTGAATCAATTTAAACCTGCAATATTTATAGCCAGTCAACATTTGCCCTTCACCCCTATATGGCCCAFAA
CTGCCAAGCACTCAGGCTCCACTCATCAACCCCTTTGACAGAGAAGANGACTTGGTTCTTATCCCTTGTCCACATAGAG
AGTTTGTATGGGGCTTGGCTGTGCCCTTCAATACAGAAATGACTTGGCATGGCTCCACCAACCAGGGATGTGGAGACA
TCTCCCAACTGCCCCTGCTCAACAGGACAGCTGCCCTTCTGTCTCCACCTCTCAGTCCCTAGRATGGATGGCTGGGAGA
GGTGGGCTGACAGCTGAGAGTGTAGTACAGATATGATCTAGGAGGGCGGATCACCCGGGATCCGGGACCATACAGTAACTAGGTT
TCCATGGCACTGTGCTCCCTTTGAAATTAAGACAGAGTCAATGCTCATGACAGGCTTCTCAGTCACTTCCACAGCCGATG
CTGCTGTCTCTAATCCAAATGGACTTGTCTCAACCCAGGATGAACAACCCAGAACICACTTCTCAGTCACTTCCAGGCCGATG
ACTCAGHNGSCAAACCCAGATGGGCCCTCTCTTTCCCAACACAGGTCATGAAAGGACCTTAGGCCATTTGTGATATCCACTCTCTTC
CCCAGTGCAGGATGGCCCTAAACGTTTTGTTAAATAACAGGTGCATGAAAGGACCTTAGGCCATTTGTGATATCCACTCTCTTC
TTTCCACTTCCCTCACTTCTTCCATGTTTTATGCTTCTCTGATTTCTTCCCTTCTGCTCCACCCAGCCAGCCCTTTA
CATCTGGGGGGTAACTCACGGGGGCAAAAATGATTTCTAAGRAGAGCTTCCPAGACCCAGCCAGGACCCAGGACCCAGGACTGTGACT
CCCCTAGCCCTGGACTTCTGAGCAGCTTTAGCCCGGCTCCGACCGCCAGGAGGCTTTCCCAATGGCTCTTCCAGAAAATNT
CTCAATGATTCATGTTCTTTTCTGGGGGAGCGGGAGGAGAGGTAGAAAATGGCAGCCACCTTCCAGAAAATNT
AAAGGTTCCAGCTGATNGTATTTGTCAGTATTTTCTGTAAATTCAAACACACACAAAGAAAATTTATTTAAATAAATA
CTTTGAAAATGAAGTCTTGATGATGTCAGATGTTACTCTTAACTTAGGATTTACCCCACTCAGACATCACTCAGAAATGA
TCAATGCAGGGACTCTTTCTGTGACRCAAAATGTCACGCCCTCCCTGGTCAACCGCTTCGCCATGTAGAGTCTAGGCTGAGGAT
GAGAAATGGTGGTCTCACCCTTGTGCABAACAGATGGCTGTGGACACAGACTCCCTCAGAGGTGCCAGTACAGGAAATA
TACTGATGTTCCCTGGCAACACTTACAGACTTTCCATCANTAGGTTCAATCAATGGCTTTTAAAGGAAAAGGGGAAATAGCAA
AAACCPTAAGGAGAAATGGACCTTTGAGTAAATCCAGTGTGTTGGGAAAGGGGATCAAAAACCTCTATAGTAGCCACTAGGGC
AAAACGTGTGATGTGTGATAGTGTGTACTGTTCAATATGGTTCAATATGGTACCBAATAGCCACATGTGACTATTTA
AATTCATGCAATGAATAAATAAATTAAGGATATAGCTC

SEQIDNO.:33	<p> CFTTCACTGGCAAGACGAGTCTGGGTTTCAGTCCAGTTCCTGCGGTGGCTGTGTGAGTTGSCAAAGTCCCTGCTGCTCT CTGGTCTGGTCCCTGCTGCTCCACGTTGAGGTTGAGGAGTGCAGCCGACGTCATTTAGCTTAGAGGAGCAGGTTCCCC GAGTCCGCGCCAGGCTTGGCATCCGAGGCCGCGCTCTCCCTCCACGCTCTCCGCGCTCTCCGCGCTCTGCGCTCTGCGCTCT GCTGCGCGCCAGGCTTGGCATCCGAGGCCGCGCTCTCCCTCCACGCTCTCCGCGCTCTCCGCGCTCTGCGCTCTGCGCTCT GAACTTGCAGCGCGAGTACTCCACCGCCGAGCCGCGCTCTTATACCCAGCGCGCTCTCCGCGCTCTGCGCTCTGCGCTCT CTGCTCCGCGCGCGCT GAACTTGCAGCGCGAGTACTCCACCGCCGAGCCGCGCTCTTATACCCAGCGCGCTCTCCGCGCTCTGCGCTCTGCGCTCT CTGCTCCGCGCGCGCT ACTGATTACTTAAAPACTTATAGACTGAGTTATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGATATCTCTACAAACRAGAAAT AATATCTGGTATTCAATGCTAAATGGAACAGCTCAGTCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGATATCTCTACAAACRAGAAAT GATATCAATCTCTGATGGCAGTTATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGATATCTCTACAAACRAGAAAT GACATTTAGTATTAAATAAAGGAGGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGATATCTCTACAAACRAGAAAT CATAAATGGCATANGTTGGACAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT GAGATTAATATAAATGAGTAACTGACTGGGTTATGAGGAGGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCAT GGCACTTTTTLGATATGCCCATAICCAAGGAGGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGATATCTCT CCAGACTGTRCGGTTCCATAICCAAGGAGGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAG TAGTACCAATGCACTTCCATACAAATCACTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCT ACAAGAAAGAAATTTCTTGCAGTGGCTCAGGAGGATTCAGACTATTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT AGATGACTGCTTAGTGGACGGCACAATGGAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT ACCTTGAATGAT TGCAATTTATACAAAGGAGGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTC AAGAAATGCGAGGAGGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGAT GAAAGGTGCTAGTACTATTTCTGCTCATTCAATGAGGAGGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCAT ACTCTACAGCGCGCTGAT CCCTCCAAAACTGGACTTATTTGAT GCAATCCCTACTATTAGAT GCAGCAGAAACATTAATGAT AGCTGGGACATTTGAAGTGAATCAATTTGAAGTGGAGGAGTTCAGATCATGATATCTCTTAGAATGAGTTCAGATCATGAT ATTTGGGCTGCTCATATGAGGAGTACGTTACTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT CCTGATCCCGTGGGAGTACTATGACTCAGTGTACACAGATTTACTAGTGGGTTCCCACTCCAGAGACACACTTGACCATAC </p>	SEQIDNO.:90	<p> NKTFWKVLGLLGAALAVITIV FVVLNKSIDDATDRSKTYTUT DYLKNTYRLKLYSLAWISDHEYL YKQENWLVFNAEYGNSSVFLFN STDFERHSHINDYSISPDGQFL DEYNYVQWHSYTYASYDYIDKN KQALITBEELFNMYQWVWSPVQ HKLAYVWNDIYVLEPNLPSYR IWTGKEDILYNGITDMVYBEV FSAYSALWNSPNGTYLVAQFND TEVELIEVSYFSDSLQYPKTVR VFYFKAGAVNPTVXFVWVWDSL SSVYNATSQITAPASMLJGSHY LCDVWATQERIISQWLRRIQNY SVNDICDIDESSGRWNLVVAQH LENSITGWVGRFRPSEPHFLDGG NSFYKILSNEEGYRHCYFQIDK KCTFFITKSTWVIGIEALTSDY LYVYSNEYKMGPFGENLYKIQLS DYTKVTCLSCELNERCOXXSVS FSNEAKYQLRCRCSGFLFLYTLH SSVNDKGLVLEDNSALDKMLQN VQMPESKLDLFIILNETKFWYQMI LPPHFDKSKRYPLLDVYIAGPCS QKADTVFLNWTYLAISTENIYV ASFDGRGSGYQGDKIMHAINERLL GTFEVEDQIEARQFSSKMGFVBN KRLAINGMSYGGYVTSWVLGSGS GVKACGLAVAPVSRWEHYDVSVT BRMGLPTPEDNLDHYRNSVYMS </p>
-------------	---	-------------	---

<p>RAENFKQVEYLLIHGTADDNVHF QQSQAQLSKALVDFGVDFQAMWYT DEDHGLRASSSTAHQHIYTHMSHFI KQCFSLP</p>	<p>AGAAATTCACAGTCTAGCGAGCTGAAAAATTTAACAAGTTGAGTACTCCCTATTCAATGGAACACAGCATATACCGTTCCAC TTTACAGAGTCACTCAGATCCCAAAGCCCTGGTCAGNTTGAAGTGGATTTCCAGGCAATGTGGTATACATGATCAAGAACATGGA ATAGCTAGCAGCRAGCRACCCACCATATATATACCCACAGTAGGACTTCTCATAAACAATGTTTCATTTACCTTAGCACCTCAA ATACCAATGCCATTTAAGCTTAATAACTCATTTTGTTTCCATTACTCATAAATGCACTGTCACAGATGATGATCTTTAABA TACACACTCAATCAAGAACTTAAGTTACCTTGTTCACAAATTTCACTAATCAATTTCTCATCAGCTGTGAAACAACAATA AGATTAACTACCTTACAGAAATTTGAATTAACCCGGTGGGTTTATTTGTAAATAATCATTTCTCATCTGACCTGCTGAAACAACAATA GGAATTTGTATTGAGGCTTGGCATAGATTCCTCTAGCAGGATTTAACTTTTAAATAATCAATTTCTCATCTGACCTGCTGAAACAACAATA TCTTTAAGGGATGGCAGAGATGGGGCAGTGTGTCTAGGGCAGGACAGGATAGAGGATTAGGGAGAGATAGCAGGGCA TGGCTGGGAAACCAGTCCAGCATACCACAGCAGCTACTGTCACTCCCCTGGGAAGACTGTTTCACRGCAGACTGGC ACAGTTTCTGAGAACTATTCACAGCTCTGAGAAATCAATATGCAAAAGACTGACTTCTAAGTAACACACAGAGTTGAA AAGACTCCAAAGAAATGTAAGGGAAACTGCCCCAGCACGCGAGGGCCCCAGGTCCAGTTATGCTATAGTTGCTACAAAACACAGCA AAGGTTGAGGGAAAGCATTGTAAATGGCTTTTAAABAAABAAATGACTGTCTTCTTAGTAAAGAGGAGGCTTGAAACTGAGTGTGA ACACAACAGCTTGCCTTTAAAGAAGAATAATTTGTATCAAAATCTTAACTTGAAGGAGTCTTGCATCAATTTTCTTATT CATTCTTGTGATGTTAAITAAAGAATAATTTAACTTCTTGAAGGAAATTTTAAABAAATGAACTAAATAACACATATGTTTATGTA TTAATATCCCAATCTACATACTATGGAATTTCTCCAGTCAITTAATAAATGTCCTTCATTTTTTCAGAAAAAABAAAAA</p>
<p>SEQIDNO. : 81</p>	<p>SEQIDNO. : 34</p> <p>CGCAGGGGTCTCTTATACCTCCAGCCTCTGGCTGCGCCCACTCCCGGTCCTAGCCGACCATGGCCGGGCC CTGCGGCACCGGCTGCTTCTGCTGGCCATCCTGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGCC CCCTGGTGGGAGCCCATGAGACCCAGCGTGGAGGAGGAGGGTGTCCGGGCTGCACTGGACTTGGCCGTCGGCGRGTACACAA GCCAGCAACGATGACACAGCCGCGCTGCAAGTGGTGGCCTGGCCTGGCCTGGCCTGGCCTGGCCTGGCCTGGCCTGGCCTGG GTGAGCTGGCCCAACCCGTTGTACCAAGACCCAGCCAACTTGGACAACTCCCTCCATGCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG GCATTCCTCTTTCCAGATCTAGCTGTCCTTGGCCGACCACTGGTGTGAAATGCCAAATCCACCTGTCCAGCAGCAGCAGCAGCAG GTACCGGCTGGCTGTGCTTATCCCTTATGCAACACTTCCCACTTCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT GGAAGTTCCCATGTCCTGACCCAGGACAGACAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CTCTTCCTTCT AAA</p>

<p>SEQIDNO. : 35</p>	<p>CCCAGCGCCCTGCAGACTTGGCACAGAGCACACCCTGCCCTTTGTACAGACACACTRAGAGGTTCTTGTGTGACAGGCTG GGTAGAGGTECTGGTCTTGCAGGGCTTCAGAGCATGAGAGGTCCTCCAACTCTGGCTGCTTGGCCCTGTCTCCAGATGGG ATCCCTTGTGAACCTAGAGAGACGCTTCGGGGATCTGCTCAACACAGAGGGCCACAGTGCCTCCCGCGCAGCGCTCCATGCA GGTCCCTCGGGAGGTGACCGCGGAGCTGGCAGCGGGCGGTCTGCTCCCTGCACCTTACGCAUCCGACCCGCCACTACGACGGGCC GCTGACGGCCATCTGGCGCTCGGGGAGCCCTGACGGGGCCCGCGAGTGTTCCTGCTCACCGCGGCCCGCGCAGCGAGCTGTGCCA GACGCGCTGAGCTGCACGGCCGCTTCCGCTGCTGGGAAACCCGCGCCGCAACGACTGTCCCTGCGCTCGAGCGCCCTCGCCCT GGGGAACAGCGGCGCTACTTCTGCGCGGTGGATTACCGCGGACGCGCCACGATCGCTATGAGAGTCCCTGCGCTCGAGCGCCCTCGCCCT CGTCACTGCTGCCCGGATCGTCAACATCTGGTGTGCGGGGCCCGGACCGCTCCGCGCGCTCCGACCGCCGAGGGGGA GCCCTCGCCCGCTCGCTGCTGGTCCCGCCAGGCAACAGCTCCGCTCCCTGACGCGCTCCGCGCGCTCCGCGCGCTCCGAGGCTGAC CGCGGATGCGCGGCTGACCCGCAAGCCCGCTACAGCTGCACTGCGCGCGCTCCGCGCGCTCCGCGCGCTCCGAGGCTGAC GTTCCGCTTCCAGCGCGCCCGGAACTGACCTTCTGCTGGCGCGCTGCGCGCGCTCCGCGCGCTCCGCGCGCTCCGAGGCTGAC TCTGGAGCGCGTCCCGCCGCGCGCTGATGATCACCCTGCTCCCGCGCGCGCTCCCGCGCGCGCTCCCGCGCGCGCTCCCGCGCT CTGGGCTCGCTGAGAAATGAGAGATCTGAAGACCTGCAATGCTCCAGCGCTAG</p>	<p>SEQIDNO. : 82</p> <p>MEGSLQLLACLACVLQMGSLVKT RRDASGDLANTERHSAPAQWNSM QVPAEVNAEAGDAVLPCTFTPH HRYDGPFLTALWRSGEPIYAGPQV FRCTAAPGSELCCQTALSLHGRFR LLGNPRNDLSLRVERLALADSG RYFCRVEFTGDANDRVERSRHVR LRVTAAPRIVNLSVLPGPAHFR ALCTAEGEPPPALAWSGPAPGNS SAALQGGHGYQVTRLEPALTRD GRYTCTAANSLGRABASVILFRF HGAFGTSLLALLLALGALKALL LGILGARATRRRLDHLVFPDTPP RADQTSPIWGSABEIEDLKLH KLQR</p>
----------------------	---	---

<p>ATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTAGAGTGCCACCATATGCGGTGTAATACCGCACAGATGCGTAGAGGAAATAACGCCATCA CCGCCATTGGCATTGAGGTCGCGCACTGTTGGGAGGCGGATCGGTGGGGCCCTCTTCGCTRTTACGCCACTGGCGAAAGGGG GATGTGTGCMAGGGGATTAAGTTGGTAACGCCAGGG</p>	<p>SEOIDNO.:37</p> <p>TTTTCCNGTCAAGCAGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCACATACGATTTAGGTGACACTATAGGCCCTCACCAACAG TTACACGGCCGCCGATGCGTGGTGGATCCTGTGAACTTCAGGCTCCTGGGCAAGTCGTGTTATTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT TGGCAAGAAATTCCTCCTCAGGTGCAGGCTGCTTACAGAGGTGGTGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG AGTCTTTTCCCTGTGCCMAAATTAATAGGGAACNCAATGAGCCCTTTAGCATCTGACTTCGGCTAATAAAGGAATTTATTTT CATTGCARAAAAAAGCCGCTAGAGTCGGCCGACGCGGAGCTTGGCTAAATCATGCTCATAGCTTTCTTCTGTGTGAA TTGTTATCCGCTCAAAATCCACACAACTAGAGCCGCGAACTTAAGTGTAAAGCCCTGGGGTCCCTATGAGTGAATCTAC ATTAATGGCTGGCTCACTCCGCTTTCAGTCGGGAACCTGTCTGCTCCAGCTGCATTAATGATCGGCCACCGGGGGAG AGCGEITTCGCTTGGGCTCTCCGCTTCTCCCTCACTGACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT TCACTCARAGGCGGTATACGGTTATCCACAGATTCAGGGATACCGGGAAGACATGAGCAAAAGCCAGCAAAAGCCAG GAACGTRAAAAGCCGCTTGTGGCTTTTCCATGACTCCGCTTTCGCTGGTCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GTGGGAAACCCGACAGACTATAAANGATACAGGCTTTCGCTGAGCTTTCGCTGGTCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT TACGGATACCTGCTCCCTTTTCCTTCGGGAAGCTGGGCTTTTCGCTGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT CGTTGCTCCAGCTGGTGTGTGTCACGACCCGCTTTCGCTGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT CCGGTAAGACAGACTTATCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCT CTGAGTGGTGGCTTACTACGCTACACTAGAAACAAACCAGCTGTTAGAGAAACAGTAATTTGGTATCTGTGTGAGGCCAGTTACCTCGGAAAG AGTTGTAGCTTTGATCCCGCAAAACAAACCAGCTGTTAGAGAAACAGTAATTTGGTATCTGTGTGAGGCCAGTTACCTCGGAAAG .AGNATCANGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGAGCTCAGGCTCAGTGGAAACGAAACTCAGTTAAGGATTTTGGTCAAGAG ATTAACAARAGATCTCACCTAGATCTTTTAAATTAATAATGAAATTTAAATCAATCTAAAGTATAATGAGTAAACTTTGGT TGACNGTTACCAATGCTTAACTAGTGGCCCTTATCTGAGGATCTGTCTATTTCTGCTATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GTAGTAACTAGATACGGGAGGCTTACCACTGCGCCAGTGCTGCAATGATACCGGAGACCCAGCTCACCGGCTCCAGATTT ATCAGCAATAACCCAGCCAGCCGGAAGGCGAGAGTGTCTGCAATTTATCCGCTCCATCCAGTCTAATAATGTTG CCGGAGCTAGAGTAGTTCCGCTAATAAGTTTCCGCAACGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GTTYGTAAGCTTCAATCAGCTCCGTTCCAAAGATCAAGGGGATTAACATGATCCCAATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTC CTTCCGCTCCGATCGTTGTCAGAGTAGTTGGCCGAGTTTATCACTGAGTTTATGGCACACTGTGATATTTCTCTTACTGT CATGCCATCCGTAAAGTCTTTCTGTGACTGGTAGTACTCAACTCACTCTGTAGATAGTGTATGCGGACCCGAGTGTGCTC TTCCCGGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCACATGACGAACTTTAAAGTCTCATNTTGAACACGTTCTTCGGGGCGAAA ACTCTCAGGATCTTACCGCTTGTAGATCCAGTCCAGTGTAAACCCACTGTTGCAACCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCAC</p>
---	--

<p>CAGGGTTCTGGGTGACCAAAAACGAGGAGGCAAAAATCCCGCAAAAAGGGAATAGGGGCACACGGAAATGTTGAATPACTCATACT CTTCCTTTTCANADATATTAAGCAITTTAAGGGTTATGTTCTCATGAGCGGTACATAATTTGAATGATTTAGAAATAAACA AATAGGGGTTCCGGACATTTCCCGAANAAGTCCACTACCTCTAAGAAACCTTATATATGACATTAACTCCCGACCTAAABAATAG GGTATACAGAGGCTTTTCTCTCGCGTTCGCTGATGAGCGTGAACCTTGTACACATGACCTCCGGACGGTCAACRGC TTGCTGTAGCGGATGCCGGAGCAGACAABCCCTGTCAGGCGCGTCAAGCGGCTTGGCGGGTTCGGGGCTGGCTTAACATAEBC GGCTCAGAGCAGATTTACTAGAGTGCCCATATCGGTGTGAATACCCTCCAGATGGCTAAGGAGAATAACCCGCATCAGGGG CCATTCGCCATTCAGGCTGCCAATGTTGGGAAGGGATCGGTGGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAARAGGGGATG TGCTCAGGCGGNTTANGTTGGTAAACGCCAGGG</p>	<p>TTTTCCAGTCAAGAGCTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCATAACGACTCACTATRGGGAGTGGGAAAAAATCACTGGACG CGTGGCGCCATAATTAAGCGGCTAGCTGAGTGATAATPAAGGAGTGAATGGCTGACGCATGCRAGCTTGGCGTAACTA TGGTCAATAGCTTTCTGTGAATTTTATCCGCTCACATTTCCACACACTACGAGCCGGAAGCATAAGTGTPAAAGCCTGG GGTCTAATGAGTGAGCTAACTACAATTATTTGGTTCGGCTACTGCGCGTTCAGTGGGAACCTGTGCTCACTGCTGCTGGCTGGCT TAAAGNATCGGCAACCGCGGAGAGCGGTTTTGCATTTGCGGCTTTCCGCTTCCCTGCTTCCGCTCACTGCTGCTGCTGGCTGGCT GTTCCGCTGGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGTTATCCACAGRATCAGGGATAAACGACGGAAGAACATG TGACAAAAGCCAGCAAAGCCAGGAACCTPAAAAAGGCCCSGGTTGTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCTTGNCGAGCAT CACAAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTTGGGAARCCGACAGACTAAGAATACAGGCTTTCCCTGGGAGCTCCCTTCGCTCAGC CGCTCTCTGTTCCGACCTTCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCCCTTCGCGGAGCGTGGCGCTTTTCATAGCTCCGCTTA TGTAGGTACTCAGTTCGCTGAGTCCACCGGTTAGACTGAGTGTGTCAGGAAACCCGACTGSCAGCACCTGTAACAGGTTAGCAGAGCG TCCGTTACTATGTTTGTGATCCTAGCAGAGTTGTTAGTGGTGGTACTACCGCTACACTRAGAGGACTAATTTGGTATCTGGCTTGG AGTATGTGGCGGCTCAGAGTTTGG CTERAAGCAGTACCTTCGGAANAAGAGTTCARAGAGTCTTGAATCTTTCTACGSGGTCAGCGCTCAGTGGGAAACGAAAAC AAGCAGAGATTACGCGCAGAAAAGAATTCAAAAGAGTCTTACCTAGATCTTTAAATTAANAATGAAGTTTAAATCAATC TCACGTTAAGGGATTTGGTCAATGATATCAAAAAGAGTCTTACCTAGATCTTTAAATTAANAATGAAGTTTAAATCAATC TAAAGTATATGATGAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAATTTCTCA TCCATAGTTCCTGACTCCGCTGTTGATRACTACGATCCGGAGGGCTTACCATCGGCCCAAGTCTGCAATGATACCCCGA GACCCAGCTCACCGGCTCCAGTTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGCGAGCGCAGAGTGTCTTGCAACTTTATTC GGCTCCATCCAGTCTAATTAATTTGCCGGAAGTGTAGTAAGTAGTCCGCAATTAATAGTTGCGRACGTTGTTGGCAATGCT ACAGGCACTGGTGTACCGTCTGCTTGGTATGGCTTTCAGCTCGGTTCCACGATCAGGCGGACTTGTATCATTCAITAGTTATG ATGTTGTCAAAAAGCGGTTACTCTTCGGTCCCGATCGGTTGTGAGTAGTGGCGGCTCTCAACCAAGTCTATCTGABNA GCAGCAGTGCATAATCTTACTGTCAAGCCATCCGAGATGCTTTCTGTGACTGGTAGTCTCAACCAAGTCTATCTGABNA TAGTGTATGGCGCAGCGAGTTGCTCTTTCGCCGCTCAATACGGATATAACGGGCCACAATGAGGACITTAAGAAGTGCICRTE</p>
---	--

SEQ ID NO. : 38

<p>GTGTTTGGTATGGTTCAITCRAGTCGGTCCCAAGCATCRAGCGGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAG CTCTCGGTTCTCCGATCGTGTACAGATAGTGGCCGCACTGTTATCACATCATGGTTATGSCAGCACCTGCATATCTCTTAC TGTATGCCATCGGTAAAGATGTTTTCTGTGACTGGTAGTACTACCCAGTCAFTCTGAGAAVAGTGTATGCGGACCGGAGTTG CTCTTCCCGCGCTCAATACCGGATATACCGCCACATGCGAGACTTTAAGTCTCATCATGGAAAACGTTCTTCGGGGCG AAACCTCRAGGAICTTCCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGATTAACCCACTCGTGCCACCACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTT CACCAGCGTTTCTGGTGTGSCAAAACAGGAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACCGAAATGTTGAATACTCAT ACTCTCTTTTCAATATATTGAGCAITTTATCAGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATTTGAAATGATTTAGAAAATAA ACBAATAGGGTTCGGCCATTTCCCGAAAGTCCACCTGACGTTAAGAACCATTTATCATGACAITTAACCTATAAAA TAGGGTATCACGAGGCCCTTCCGCTCGGCGTTTCGGTGTGATGACGGTGAAPAACTCTGACACTGCCGAGAGCGGTCAC AGCTTGTGTAAAGCGGATGCCGGAGCAGACAGCCCGTCAGGGCGGTCAGCGGGTGTGGGGGTTGGGGTGGCTTAACTA TGGGCATCAGACAGATTGTCTGAGAGTGCACATATGCGGTGTGAATACCCACAGATCGGTAAAGGAGAAATACCCCATCAG GCGCCATTCGCCAFTCAGGCTGCGCACTGTTGGGAGGCGCATCGGTGGGGCTCTTCTCTATTACGCCAGCTGGCGAAGGGGG ATGTCTGCAAGCGGATTAAGTTGGGTACGCCAGGG</p>	
<p>SEQIDNO.: 40</p>	
<p>AATTTAATACGACTACTATAGGAGAGAGACCCCTGGATAGGT</p>	
<p>SEQIDNO.: 41</p>	
<p>GCCTGCACCAACAGTTAACA</p>	
<p>SEQIDNO.: 42</p>	
<p>CAGGCCAGGATCCAAAT</p>	
<p>SEQIDNO.: 43</p>	
<p>TCCCCTTTGGGTCAAA</p>	
<p>SEQIDNO.: 44</p>	
<p>GCGCGCGGATCGTCAACA</p>	
<p>SEQIDNO.: 45</p>	
<p>ACACGTGCACGGCGGCCAA</p>	

14 C

SEQIDNO : 46

TCGGCGTTTCGGTGATGACGGTGMMAAACCCTGTGCACATSCAGSTCCCGAGACGGTCAAGCTGTCTGTAAGCCGATGCCGGGA
GCAGACAGCCCGTCAAGGGCGGTACGGGTTGGGGTTGGGCTGGCTTAACTATATGCBGCATCAGAGCACAGATTGACTGA
GAGTGCACCATATAGCGGTGTAATAATCCGCACAGATYGGTAAGAGAAATAACCCCATAGAGGGCCATTCGCCAATTCRGGCTGGCA
ACTGTTGGAAAGGGGATCGGTGCGGCCCTTCGTATTTCAGCAGCTGGGAAGSSGATGCTGCAGAGCGGATTAAGTTGGG
TAAACCCAGGGTTTCCACATCACACGAGCTGTAAACGACGGCCAGTCCCAAGCTTTCCAAAACTACCCTGTTATAGTGTCT
CTTCAACACCTATACACACCGTAGTGATCCCGCGCTTCACACAGATATATAACCCAGAAATTAATTACTTTACTCAGTACGTATTTGT
GTAAGCTATGATAGTCCATTTAAACATAAATTTAAACATGCAACTCCCAAGAAATTAATTACTTTACTCAGTACGTATTTGT
ACTAATATCTTTGTGTTACAGTCAAATAATTCTAATTAATCTCTTAACAGCTTTGTAATCGTATATSCAATATAAGNAATCATG
GGAATAGGCCCTTCTCCCTCCCGGACCTTGGCGCGCTCGCGCCGGTACGCCCTCGTACGTTGGCTTTGSCCTGGCGGCT
TTCCACTGGGAATTCAGTCTCTCCCTCTAGTGGTAATCTCCTCTCTCCCTATAGTAGTGGTAAATTAATTCCTCTCT
TCTATAGTGCACCTAATCGTTGCATTCGTAATCAGTCAATAGCTGTGTTCTGTGTGAATTTATCCCTCACAATTCACAC
AACAACGAGCCGGAATTAAGTGAAGCCGCGGTGCTAATGAGTAGTACTACTACTAATTTGGCTGCCCTACTECCC
GTTTCCAGTGGGAACCTGTGTCGACCTGCATTAATGAAATCCGCAAGCCTGGGAGAGCGGTGTGTATTTGGTATTTGGCGGCTT
TCCGCTCTCTGACTCCTGCT
TCCRAGATCAGGGATAACGAGGAAGAATGTGAGCAAAAAGCCACAAAAGCCAGAACAGGACCTAAABAGGCCCGCTTGCCTA
EGGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCTGAGCATCACAAATCCGACTCAAGTCAGGTTGGGAAACCCGACAGGCTATAA
AGATACCAGGGCTTCCCTCCCTGGAGCTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CCCTCGGGAAGCGGCGCTTTCTCATAGTCTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CAGGACCCCGCTTCCGCTACAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CTGGCAGCAGCCACTGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGTATGTAAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TACATAGAAGAACATTTGTTGCT
AAAACCCCGCTGGTAGCGGTTTGTGTTGCAGCAACAGATTAAGGATTTGGTCAAGATTAATCAAAAGATCTCAAGAAGATCTTGTATC
TTTTCTACGGGCTCAGCCTCAGTGNACGAATACTCACGTTAAGGATTAATGAGTAACTTGGTCTGACAGTACCAATGCTTAATCAGT
ATCCTTTTAAATTAAGATTTAAATCAATCAAACTAAGTAAATGAGTAACTTGGTCTGACAGTACCAATGCTTAATCAGT
GAGCACCTATCTCAGCATCTGCTATTTGCTTCACTCCATAGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TTACCATCTGGCCCGTCAATGATCCGCGAGACCCGCTCAGATTATCAGCNATAAACCCAGCCAGCCGGG
AGGSCCGGCGRAGGTCTTCACTTTAACCCTCCTCCATCCAGTCTAATTTGCTGCGGGAAGCTAGTAGTAGTGTCC
CCAGTAAATAGTTTCCGCAAGTTGCT
GGTTCCAAACGATCAGTGTACATGATCCCATGTTGSCAAAAGGGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
AGTAAAGTGGCCAGTTATCCTCATGTTAGGATAGTCCGAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GTACTGTTGAGTCAACCAAGTCTGAGAAAGTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ACCGGCCCATAGCAGACTTAAAGTCTCAATGGAAACCTTTCCGGGCGAAACTCTCAGGATCTTACCCTGTG

AGATCCAGTTCGATGTAACCACTCGTGCACCCCAACIGATCTTCAGACATCTTTTACTTTCACCAGGTTTCTGGGTGAGCAAAACA
 GGAAGGCAAATGCCCCGCAAAAGGGAAATAGGGCCGACAGGAAANGTTGAAATACTCRDACTCTTCCTTTTTCRAATATATATGAGC
 AATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATAATTTGNATCTATTAGAAATATTAACAATAAGGGGTTCCGGGCACATTTCCC
 CGAAAGTGCACCTATTGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGAGATGCAAGCATGCAATCTCAATTAATGTCAGCAA
 CCAGGTGAGAAAGTCCCAGGCTCCCAAGGAGAGATGCAAGCATGCAATCTCAATTAATGTCAGCAAAGGATGTCAGTCCCGCCCC
 TACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGGCCATTCCTCCGCCCCATGTCAGGAGGCTTTTGGAGGCTTAGGCTTTGCAAAAGCTAGCTTGCA
 CCGAGCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCAGAGTAGTGGAGGCTTTTGGAGGCTTAGGCTTTGCAAAAGCTAGCTTGCA
 TGCCTGCAGTCCGCCACAGCCGGTGCGCCACCATCCCTGACCCAGCCCTGACCCCTCAAGGAGACGACCTTCCCATGA
 CCGAGTACAGCCCAAGTCCGCTCCGCCACCCGKACGACGTCGCCCGGGCCGTAGCCGACCTCCCAAGGAGACGACCTTCCCATGA
 CCGCCACCGCCACACCGTGCACCCGGACCCGACATCGAGGCGTCCGAGCTGCAAGAACTTTCCTCACGGCGTCCGGCTCG
 ACATCGGCAAGGTGTGGTTCGGGACGACGGCCCGGGTGGACCAAGGAGGAGGCTCGAAGCGGGGGGGTGTTCG
 CCGAGATCGGCCCCGCAATGCGAGTTGAGCGGTCCCGGTTGGCCGGCCAGCAACAGATGGAAGGCTTCTTGGGCCCCGACCCGGC
 GAGTGGGGCCGCGGAGCGGCGGCGGCTCCGAGACTCCGAGGAGGCTTGGGCAAGGGTCTGGGCAAGCGGCTGGTCTCCCGG
 TCAACCGTACCGCCGACTCGAGTCCCGAAGGACCGGCACTTGTGCACTACCCGCAAGCCCGGCTCCGACGCGGCTCGGCT
 ACCCGCAGCCCGACCGAAGGAGCGACGCCATGGTCCGACCGAAGCCACCGGGGGGGCCCGGACCCCGCACCCGCTC
 CCGGSCCCACCGACTTAGAGGATCATATCAGCCATACPCATTTGTAGAGGTTTACTTGTCTTAAAAACCTCCCAACCTC
 CCCCYRACTGAAACATRAAATGCAATGTTGTGTTGTTACTTGTATTGAGCTTATTAATGTTACAAATAAAGCAATAGC
 ATCACAAATTTCAAAATAAGCATTTTTTTCAGTGCANTCTAAGAACCTTATTATCATGACATTAACCTTFAAAATRGGCGTA
 TCACGAGCCCTTTCCGTC

SEQIDNO. : 47

TAGTTATTAATAGTAATCAATACGGGGTCAATAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGCGTACATAVAACITACGGTAAATGGCCC
 GCCTGCTGACCCCAACGACCCCGCCCAITGACGTCARATGACGTAATGTTCCCATAGTAAACGCCAANTAGGGACTTTCATATG
 ACGTCAATGGGTGAGTATTTACGGTAACTGGCCACTTGGCAGTACATGCAATGATATGATGCAAGTACCCCTATTAGCT
 CAATACGGTAAATGGCCCGCTGGCATATGCCCCAGTACAGCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTAATAGT
 CATCGTATTACCATGGTGTATGGGTTTGGCATACATCAATGGCCGTTGATAGCGGTTTBACTCAGGGGATTTCCRAAGTCTCCA
 CCCCATTACGTCAAATGGGAGTTGTTTTGGCACCAATTCRACGGACTTTCCTAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCA
 AATGGCCGTAGGCGTGTACGGTGGAGTCTATATAAGCAGAGTGGTTTAGTGAACCGTCAATCCGCTAGCCGCTACCCGGACTCA
 GHVCTCGAGCTCAAGCTTCGARITCTGACGTGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGGCCCGGACTCTAGATCATATATCAGC
 CATACCAATTTGTAGAGTTTACTTTCCTTTAAACACTCCACACCTCCCACTCCCTCCCTGACCTGAAACATAAATGATGCAATTTGT
 GTTTCAACTTTATTCAGCTTATAATGGTACAAATAAGCAATAGCATCAAAATTCACAAATAAGCATTTTTTTTCACTG
 CATTCTAGTTGGTTGTCCAACTCATCAATGTAICTTAAGGTAATTTGPRAGCTTAATAATTTGTTAAATTTGCGGTAA
 TTTTTTAAATCAGCTCAITTTTTAACCAATAGCCGAATCCGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTT
 GAGTGTGTTCCAGTTTGAACAGAGTCCACTPATTAAGAACCTGGACTCCACGTCAAAGGGCGAAACCCGTCATACAGGGCGA
 TGGCCACTACGIGAACCATCACCTTAATCAGTTTTTGGGGTCCAGTCCGTAAGCACTAATCSGAACCCCTAAAGGGAGCCC
 CCGATTAGACTTGAACGGGAAGCCCGGACACTGSCGGAAGGAGGGAAGRAAGCGAAGCGGCGCTAGGGCGCTAGGGCGCTGSC
 AAGTGTAGCGGTACGCTGCGGTAACTCCACCCACCGCCGCTTAATGCGCCCTACAGGGCGGCTCAGTGGGCACTTTTCGGG
 AATGTGGCGGNAACCTATTGTTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTCATGACCAATAAACCCCTGATAAATGCT
 TCAATATATGAAAAGGAGAGTCTTAGGGGAAAGAACCAAGCTGTGGAATGTGTGACAGTGTAGGTTAGGAAAGTCCCAAGTCCCGAGG
 TCCCAGCGCAGAGTATGCAAGCATGCAATTCATATAGTCAGCAACCCAGGTGTGAAAGTCCCAAGTCCCGAGCTCCCGCCAGTTCC
 AGTATGCAAGCATGCAATTCATATAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCCGCCCACTCCCGCCCTAATCCCGCCCTCAGAGTAG
 GCCAATTCGCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGACAGGCGCCGAGGCGCCCTGAGCTATTTCAGAGTAG
 TGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTGCAAGATCGATCAGAGCAGGATGAGGATCGTTCCGATGATGAAACRAGATGG
 ATTGCACCGAGTTCCTCCGCCCTTGGGTGGAGGCTATTCCGCTATGACTGGCCACACAGACAAATCGGCTCTCTGATGCGGC
 AGCGGCTATGCTGGCTGCCCCAGCGGGCGTTCCTTGGCAGTGTCTCGAGTCCGAGTCCGAGTCCGAGTCCGAGTCCGAGTCCGAGT
 AFTGGCGAAGTCCGGGGCAGGATCTCTGTCTCATCTCACCCTGCTCTCCGAGAAAGTATCCATGATGCTGATGCAATGCGGCG
 GCTGCATACGCTTGAATCCGCTACCTGCCCCATTCGACACACAGGAAACATCGCATCGAGCGACACGTAAGGCGGAGCATGCCCCG
 TCTTGTGATCAGGATGATTCGACGAGCATCAGGGCTCGCGCCACCGAATGAGGAAATGCGCCCTTCTGAGTTCATCGACTG
 CGCGAGGATCTCGCTGTGACCCATGGCGATGCTGCTCGAATATGAGTGGAAATGCGCCCTTCTGAGTTCATCGACTG
 TGGCCGCTGGGTGGCGGACCGTATCRGGACATAGGTTGGCTAACCCTGATATGCTGAGAGAGTTCGGCGGCGAATGGGCTGA
 CCGCTTCTGCTGCTTACGGTATGCGGCTCCCGATTCGAGGACCTCCCTATGCTTTCGAGTTCCTGAGCGGG
 ACTCTGGGGTTGAAATGACCGEACCAAGCGACCCCAACTGCACTCACAGATTTGCAITCCACCGCGCCCTTCTATGAAAGGTTG

<p>SEQIDNO.:84</p> <p>ATGCCGGGCTGCTGCTGGCTCCGGCTTFTGTTGCTACCCGGAGTCTGTGACCATGGCCCTCTGGNAGCCCTCCGACCCAG CCCTCGCGGCTCGGATTCGGCTCTGGCTAAGTTCGGGCTGCTGAGCCTTTGTTACTTGGAGCCTTTGTTACTTGGCCCAACGRGANGGTGCGC AAGGAGATGCGCCAGGGCCGTGGAGAGCCCTAGCAGCCTGCGTCAACCTCACTCCAGATTCACATCCACTATGAGTGGAAA GGGAGATCGAGGAGACAGTGGGTCTGATGATGATTAAPACCCAPAGTTCCTGGTCCCGCTTTGACAGATTTTGTTCGTTCT GTGCCCTTACGANGTGGCCGAGGTAATGCAATGCTGTGGARACAGGGGAACCTTCCGTAACCTGACGTGGGTGGCCAGGTACCA GAGTCAGTTTCTEACTCTATCACAGTCCCTGCCATGA</p>	<p>Indéntico a SEQIDNO.:49</p> <p>MIGSGLAGSGGAGGSPSTVTWCA LFSNHVAATCASLALLSPVMPAL LPVASRLLLPRVLLTMSGSPF TOPSPASDSSGGVYVFGSVSRAFV TCENEKVAKEIARAVWERKLAAC VNLIPOITSIYBWKGIKIEEDSEV LMINKTQSSLVPALJDFVRSVHP YEVAEVIALLPVBQGNFPYLQVVR QVTEVSVDSTITVLE</p>
<p>SEQ ID NO. 85:</p> <p>CRGTGCCAACATGTCAGGTTTGCTCATINFACTTTTGGCCAGTTGGTGTCTEACCCCATTTACTGTCATTTTGCATTAGGTA TATTTCTTAATGCTATCCCTCCCTCCCTCCACCCCAACAGTCCCGCTGGTGTGATCTTCCCAATTTTTTTTTCTCAT CANGATTTCTPAAACAACTTGAATGAACAACATTTGAGATCTGCTATATTTGAAATAAATAACTPAAATAATPACAAA TTTTAAABAATACAGTGTAPACACTATTTACATAGATTTACATTTGTATTAGTATTGANGTAAATCTAGAGTTGATTTAAAGGAGGG GNGTCCAAACTTTTGGCTTCCCTGGGCCACACTGGGAANANDATGTCTTGGGCTACCCATARAATACACTAACAAATAGCTGATAC GA</p>	
<p>SEQ ID NO. 86</p> <p>GCTGATTTACAGGTTTCCCTTATAATATTCAANTGTCCATTTTCAATPACAGCACAACTPACAAAGAACAGGAAATAGT CTACTCACAGA</p>	

Referencias

PATENTES:

Patente de los EE.UU. n.º 5 712 127 Malek et al., 27 de enero de 1998

Patente de los EE.UU. n.º 6 498 024, Malek et al., 24 de diciembre de 2002

- 5 Solicitud de patente de los EE.UU. n.º 11/000 958 registrada el 2 de diciembre de 2003, publicada con el número US 2005/0153333 A1 el 14 de julio de 2005 y titulada «Selective Terminal Tagging of Nucleic Acids»

Patente de los EE.UU. n.º 6 617 434 Duffy, 9 de septiembre de 2003

Patente de los EE.UU. n.º 6 451 555 Duffy, 17 de septiembre de 2002

OTRAS REFERENCIAS:

- 10 1. Frost H. M., 1964 Dynamics of Bone Remodeling. En: Bone Biodynamics, Little and Brown, Boston, MA, USA pp.315.
2. Baron, R., Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements, En: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 5.ª edición 2003, American Society for Bone and Mineral Research, Washington DC, pp.1-8.
- 15 3. Jilka, R. L. et al., «Increased Osteoclast Development After Estrogen Loss: Mediation by Interleukin-6», Science 257: 88-91 (1992).
4. Poli, V. et al., «Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion», EMBO J 13: 1189-1196 (1994).
- 20 5. Srivastava, S. et al. «Estrogen Blocks M-CSF Gene Expression and Osteoclast Formation by Regulating Phosphorylation of Egr-1 and Its Interaction with Sp-1», J Clin Invest 102: 1850-1859 (1998).
6. de Vernejoul, M. C., «Dynamics of Bone Remodeling: Biochemical and Pathophysiological Basis», Eur J Clin Chem Clin Biochem 34: 729-734 (1996).
7. Netzel-Arnett, S., J. D Hooper, et al. (2003). «Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer». Cancer Metastasis Rev 22(2-3): 237-58.
- 25 8. Shan, J., L. Yuan, et al. (2002). «TSP50, a possible protease in human testes, is activated in breast cancer epithelial cells». Cancer Res 62(1): 290-4.
9. Yuan, L., J. Shan, et al. (1999). «Isolation of a novel gene, TSP50, by a hypomethylated DNA fragment in human breast cancer». Cancer Res 59(13): 3215-21.
- 30 10. Nishi, T. y M. Forgac (2002). «The vacuolar (H⁺)-ATPases: nature's most versatile proton pumps». Nat Rev Mol Cell Biol 3(2): 94-103.
11. Nishi, T., S. Kawasaki-Nishi, et al. (2003). «Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms». J Biol Chem 278(47): 46396-402.
12. Morello, R., L. Tonachini, et al. (1999). «cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of Crtp encoding the mouse cartilage associated protein». Matrix Biol 18(3): 319-24.
- 35 13. Tonachini, L., R. Morello, et al. (1999). «cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of the gene encoding human cartilage associated protein (CRTAP)». Cytogenet Cell Genet 87(3-4): 191-4.
14. Kawai, J., A. Shinagawa, et al. (2001). «Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection». Nature 409(6821): 685-90.
- 40 15. Strausberg, R. L., E. A. Feingold, et al. (2002). «Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences». Proc Natl Acad Sci USA 99(26): 16899-903.
16. Janssen, E., M. Zhu, et al. (2003). «LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation». Nat Immunol 4(2): 117-23.
17. Kawaida, R., T. Ohtsuka, et al. (2003). «Jun dimerization protein 2 (JDP2), a member of the AP-1 family of transcription factor, mediates osteoclast differentiation induced by RANKL». J Exp Med 197(8): 1029-35.

18. Agrawal, N., P. V. Dasaradhi, et al. (2003). «RNA interference: biology, mechanism, and applications». *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4): 657-85.
19. Hannon, G. J. (2002). «RNA interference». *Nature* 418(6894): 244-51.
- 5 20. Brummelkamp, T. R., R. Bernards, et al. (2002). «A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells». *Science* 296(5567): 550-3.
21. Elbashir, et al. (2001). «Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells». *Nature* 411(6836): 494-8.
- 10 22. Lee, J. S., Z. Hmama, et al. (2004). «Stable gene silencing in human monocytic cell lines using lentiviral-delivered small interference RNA. Silencing of the p110alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase reveals differential regulation of adherence induced by 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol and bacterial lipopolysaccharide». *J Biol Chem* 279(10): 9379-88.
23. Rubinson, D. A., C. P. Dillon, et al. (2003). «A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference». *Nat Genet* 33(3): 401-6.
- 15 24. Boyle, W. J., W. S. Simonet, et al. (2003). «Osteoclast differentiation and activation." *Nature* 423(6937): 337-42.
25. Gee et al. En: Huber y Carr (1994) *Molecular and immunologic Approaches*. Futura Publishing Co., Mt. Kisco N.Y., pp. 163-177.
- 20 26. Smith, A. N., F. Jouret, et al. (2005). «Vacuolar H⁺-ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone». *J Am Soc Nephrol* 16(5): 1245-56.
27. Smith, A. N., J. Skaug, et al. (2000). «Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing». *Nat Genet* 26(1): 71-5.
28. Stehberger, P. A., N. Schulz, et al. (2003). «Localization and regulation of the ATP6V0A4 (a4) vacuolar H⁺-ATPase subunit defective in an inherited form of distal renal tubular acidosis». *J Am Soc Nephrol* 14(12): 3027-38.
- 25 29. Malkin I, Dahm S, Suk A, Kobylansky E, Toliat M, Ruf N, Livshits G, Nurnberg P. Association of ANKH gene polymorphisms with radiographic hand bone size and geometry in a Chuvasha population *Bone*. 2005 feb; 36(2): 365-73.
30. McMahon C, Will A, Hu P, Shah G N, Sly W S, Smith O P. Bone marrow transplantation corrects osteopetrosis in the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Blood* 2001 1 de abr; 97(7):1947-50.
- 30 31. Biskobing D M, Fan D. Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int*. 2000 ago; 67(2): 178-83.
32. Brage M, Abrahamson M, Lindstrom V, Grubb A, Lerner U H. Different cysteine proteinases involved in bone resorption and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int*. 2005 jun; 76(6): 439-47. Epub 19 de mayo de 2005.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de osteopatías que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 a) SEQ ID n.º 48,
- b) un polipéptido codificado por SEQ ID n.º 1,
- c) un fragmento de cualquiera de a) o b) que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos, y
- d) un análogo de cualquiera de a) o b) que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos, en donde dicho análogo tiene al menos una similitud de secuencia del 90% con el polipéptido de a) o b),
- 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. Composición farmacéutica para uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de osteopatías, en donde la composición farmacéutica comprende un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:
- a) un polinucleótido que comprende la SEQ ID n.º 1,
- 15 b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de los nucleótidos 150 a 1136 de SEQ ID n.º 1,
- c) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a a) al menos al 80% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
- d) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a b) al menos al 90% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
- 20 e) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a a) al menos al 80% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido, y
- f) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a b) al menos al 90% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
- y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 3. Polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:
- a) un polinucleótido que comprende la SEQ ID n.º 1,
- b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de los nucleótidos 150 a 1136 de SEQ ID n.º 1,
- c) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a a) al menos al 80% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
- 30 d) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a b) al menos al 90% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
- e) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a a) al menos al 80% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido, y
- f) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a b) al menos al 90% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,
- 35 para el uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de una osteopatía.
4. Polinucleótido aislado para uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de una osteopatía de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la osteopatía se selecciona del grupo que consiste en la osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercortisolismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo, fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos y daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos.
- 40
- 45

5. Polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- SEQ ID n.º 48,
 - un polipéptido codificado por SEQ ID n.º 1,
 - un fragmento de cualquiera de a) o b) que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos, y
- 5 d) un análogo de cualquiera de a) o b) que es capaz de favorecer o inhibir la diferenciación de los osteoclastos, en donde dicho análogo tiene una similitud de secuencia de al menos el 90% con el polipéptido de a) o b), para el uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de una osteopatía.
6. Polipéptido aislado para uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de una osteopatía de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la osteopatía se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercorticalismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo, fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos y daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos.
- 10 7. Compuesto capaz de interferir con la actividad o expresión de un polipéptido seleccionado entre la SEQ ID n.º 48 o un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 1 para uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de una osteopatía, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos o fragmentos de fijación a antígeno del mismo que se fijan específicamente a un polipéptido seleccionado entre SEQ ID n.º 48 o a un fragmento del mismo, y los siRNA o shRNA que inhiben específicamente la actividad o la expresión de un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 1.
- 15 8. Compuesto para uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de una osteopatía de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado o un fragmento de fijación a antígeno del mismo.
- 25 9. Compuesto para uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de una osteopatía de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho fragmento de fijación a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento F_v.
- 30 10. Compuesto para uso en la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, en la prevención de osteopatías o en el tratamiento de una osteopatía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la osteopatía se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercorticalismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo, fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos y daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos.
- 35 11. Utilización de un polinucleótido aislado, polipéptido aislado o compuesto como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 3, 5, 7, 8 o 9 en la fabricación de un medicamento para la modulación de la diferenciación de los osteoclastos in vivo, para la prevención de osteopatías o para el tratamiento de una osteopatía.
- 40 12. Utilización de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la osteopatía se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercorticalismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo, fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos y daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos.
- 45 13. Utilización de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
- un polinucleótido que comprende la SEQ ID n.º 1;
- 50 b) un polinucleótido que comprende el marco abierto de lectura de los nucleótidos 150 a 1136 de la SEQ ID n.º 1;
- un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a a) al menos al 80% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido;

d) un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica a b) al menos al 90% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,

e) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a a) al menos al 80% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido, y

5 f) un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a b) al menos al 90% a lo largo de toda la longitud del polinucleótido,

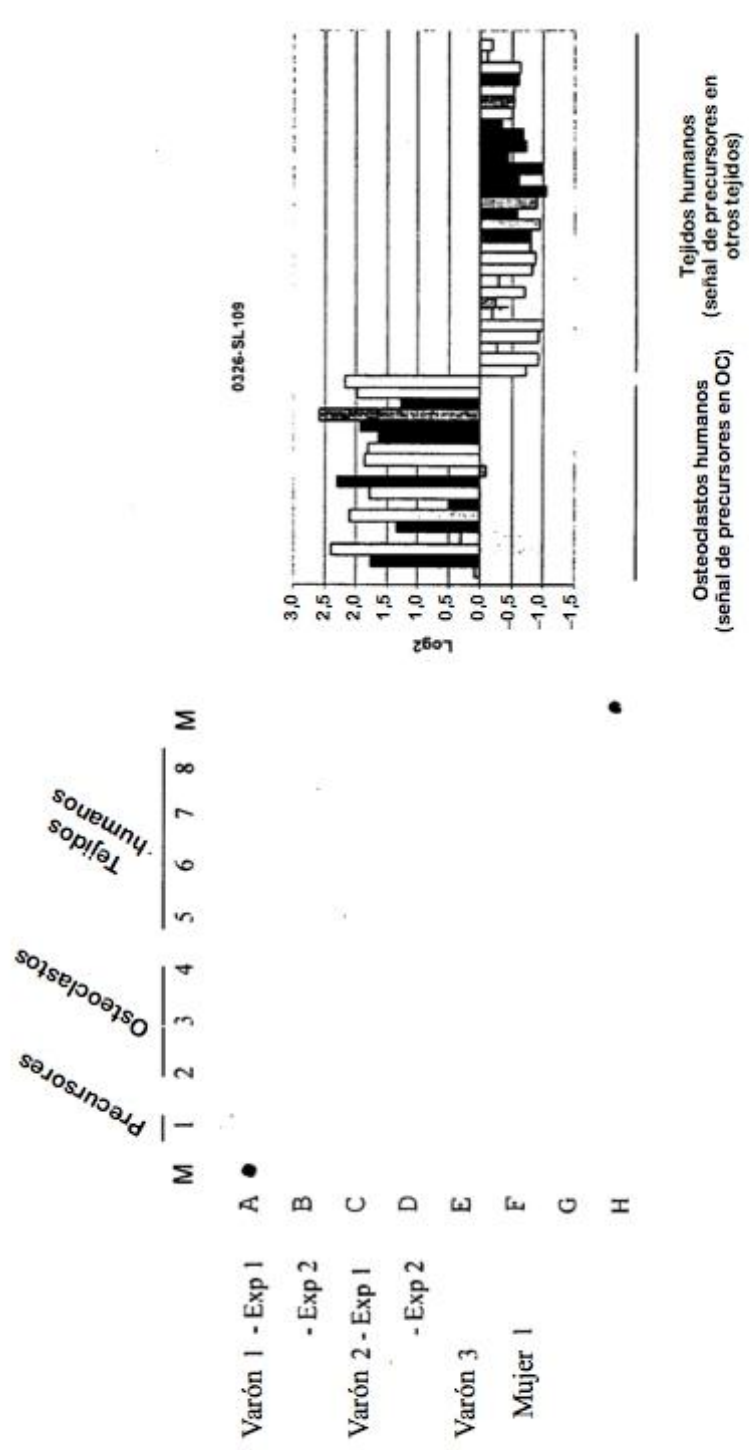
en el diagnóstico in vitro de una osteopatía.

10 14. Utilización de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la osteopatía se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hipercorticalismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipocalcemia, artritis, periodontitis, raquitismo, fibrogénesis imperfecta ósea, trastornos osteoescleróticos y daño ocasionado por procesos inflamatorios mediados por macrófagos.

15 15. Procedimiento para identificar un compuesto inhibidor capaz de afectar la expresión o la función de un polipéptido de SEQ ID n.º 48, o un polipéptido codificado por la SEQ ID n.º 1, en donde el procedimiento comprende poner en contacto dicho polipéptido o una célula que expresa dicho polipéptido con un compuesto candidato y medir la expresión o la función de dicho polipéptido, por medio de lo cual una reducción de la capacidad del polipéptido para favorecer la diferenciación de los osteoclastos identifica positivamente un compuesto inhibidor adecuado.

20 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, que además comprende una etapa de inducción de la diferenciación de los osteoclastos cuando se pone en contacto dicho polipéptido o célula con un compuesto candidato.

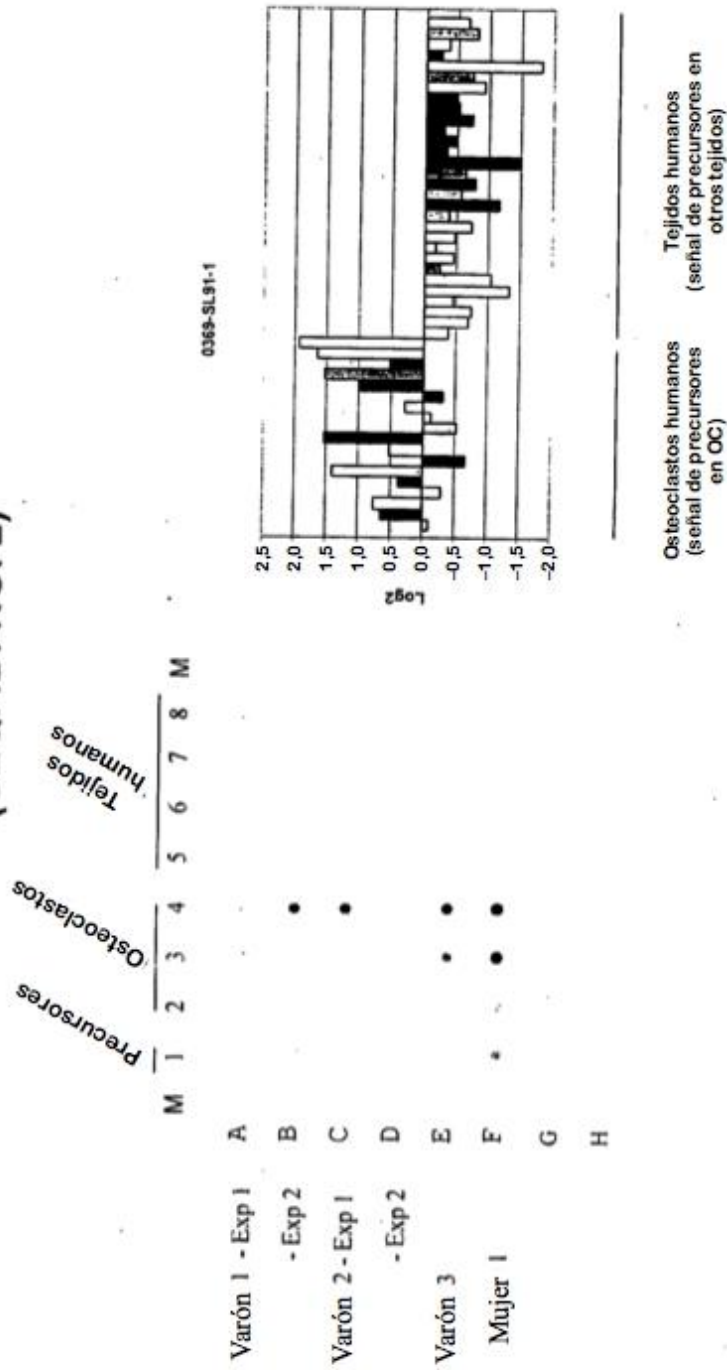
Fig.1
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 1)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

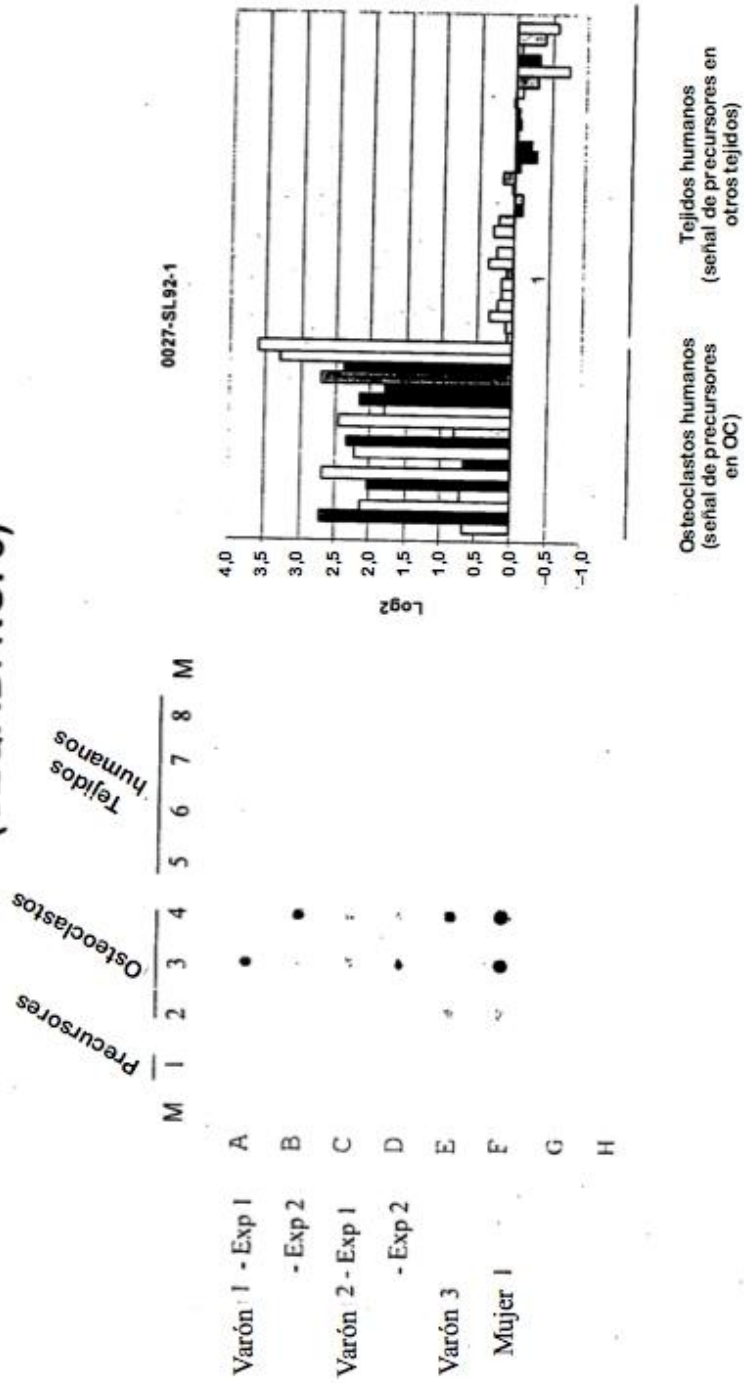
Fig.2
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 2)



Macromatriz

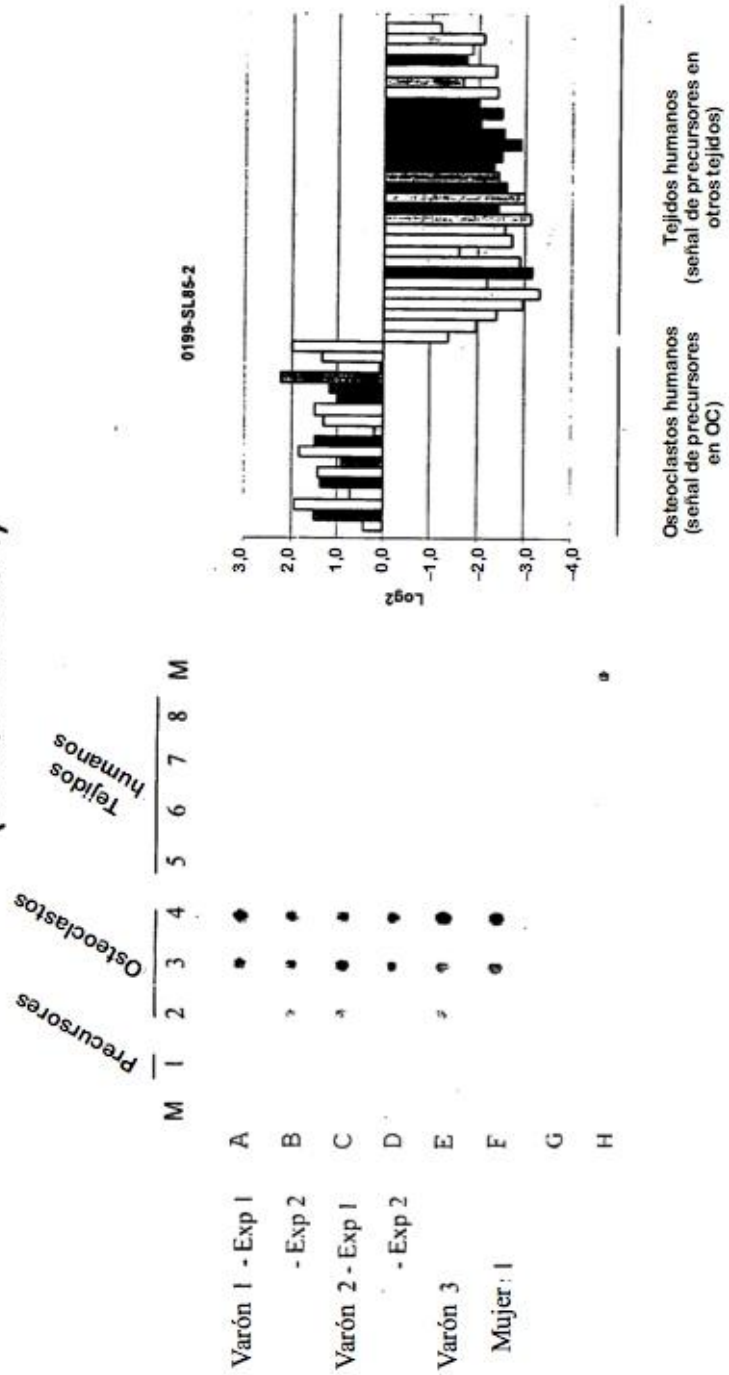
Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 3
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 3)



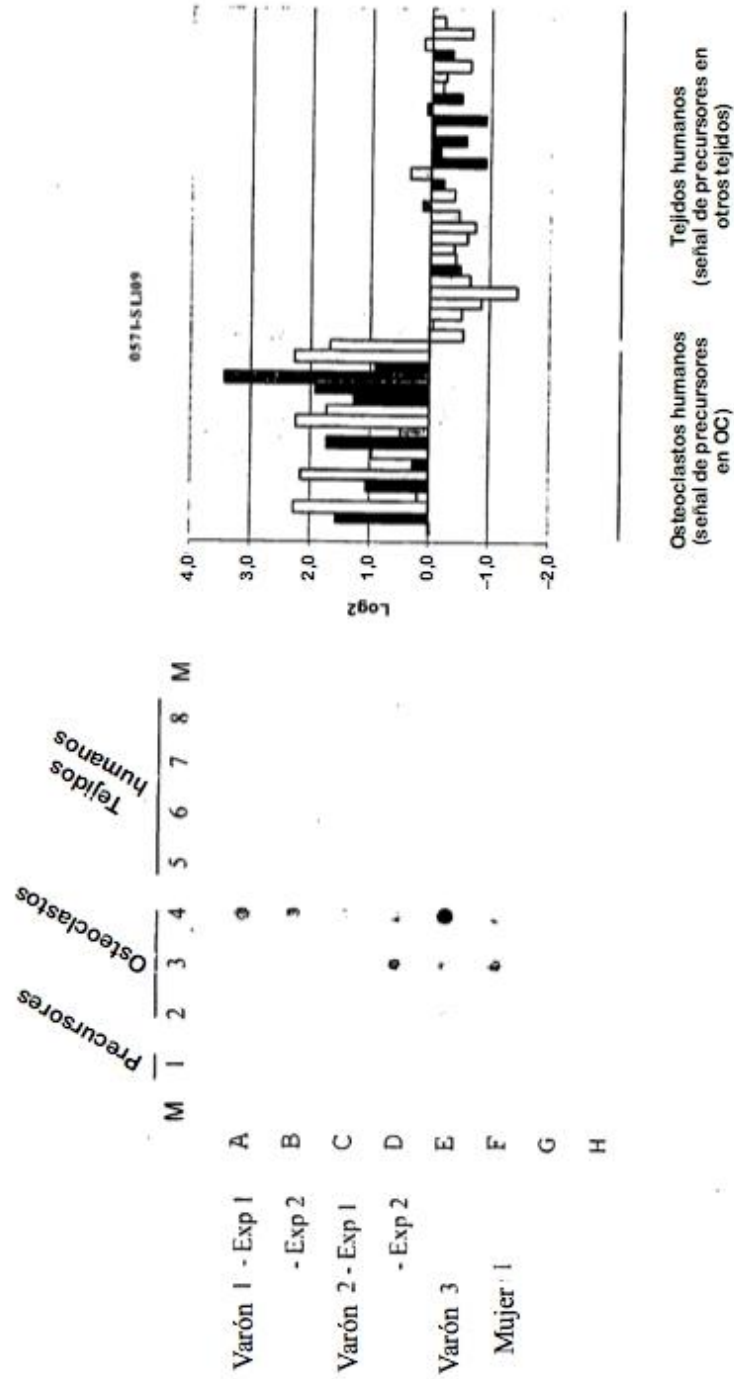
Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

Fig. 4
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 4)



Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

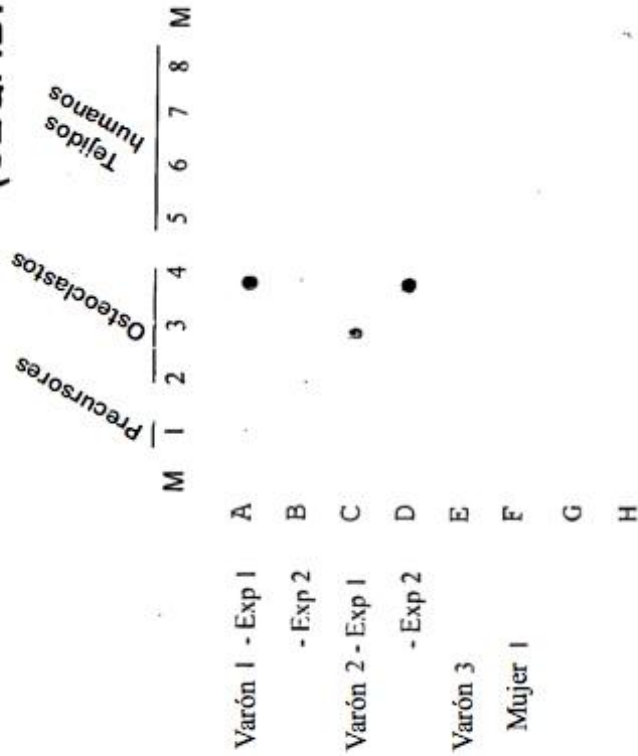
Fig. 5
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 5)



Macromatriz

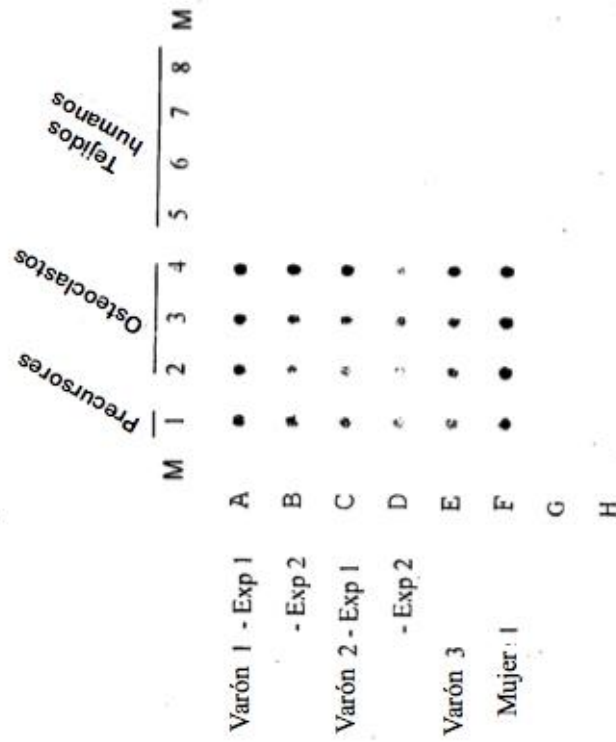
Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 6
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 6)



Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

Fig. 7
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 7)



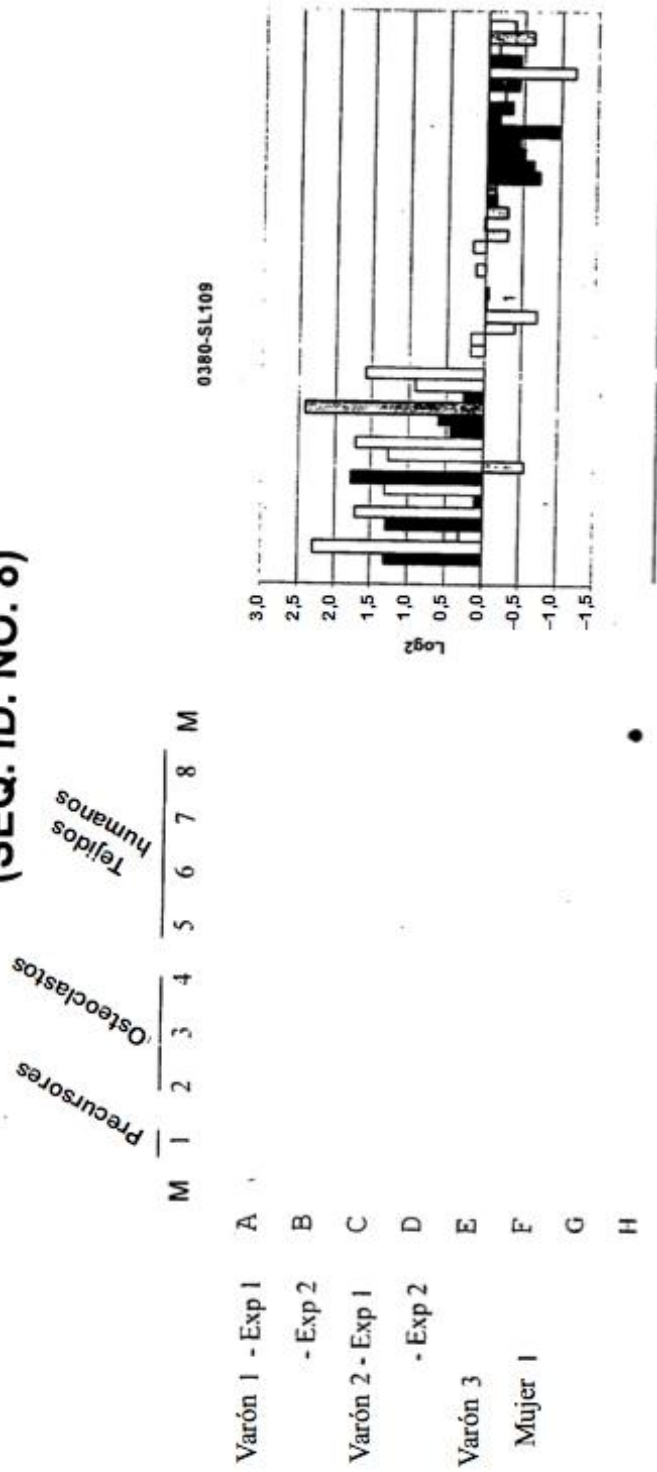
Osteoclastos humanos
 (señal de precursores
 en OC)

Tejidos humanos
 (señal de precursores en
 otros tejidos)

Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 8
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 8)



Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

Fig. 9
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 9)

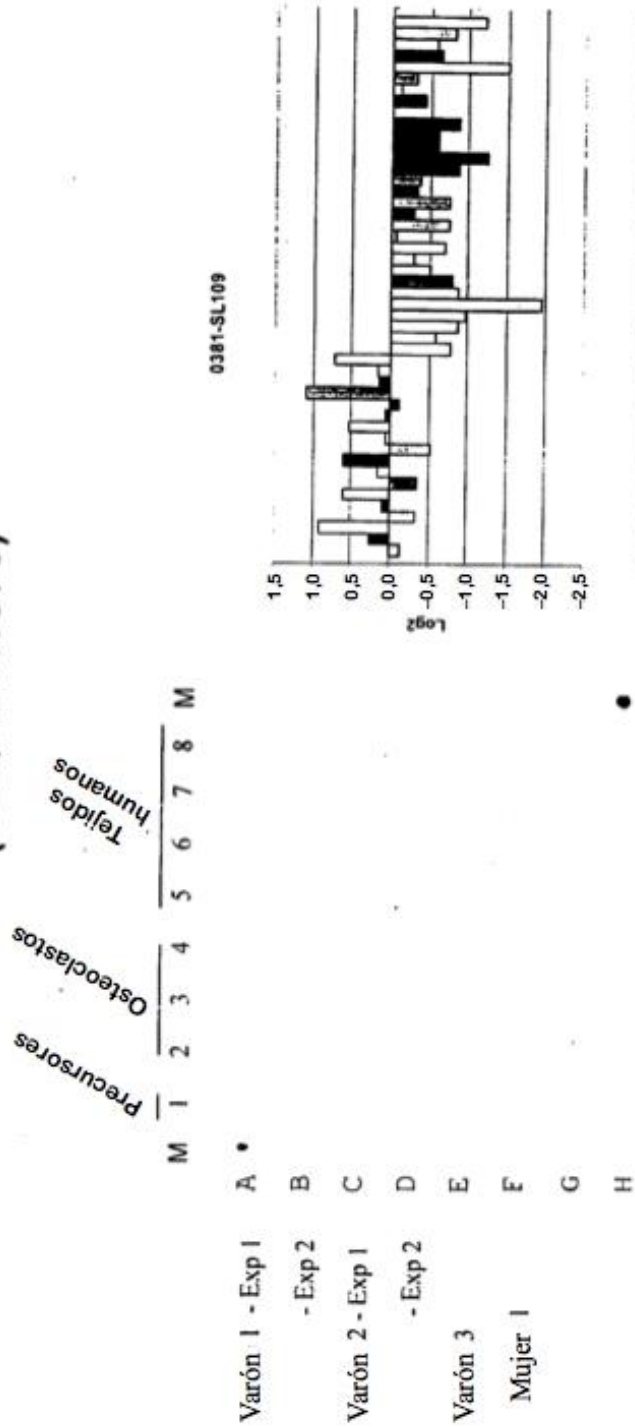
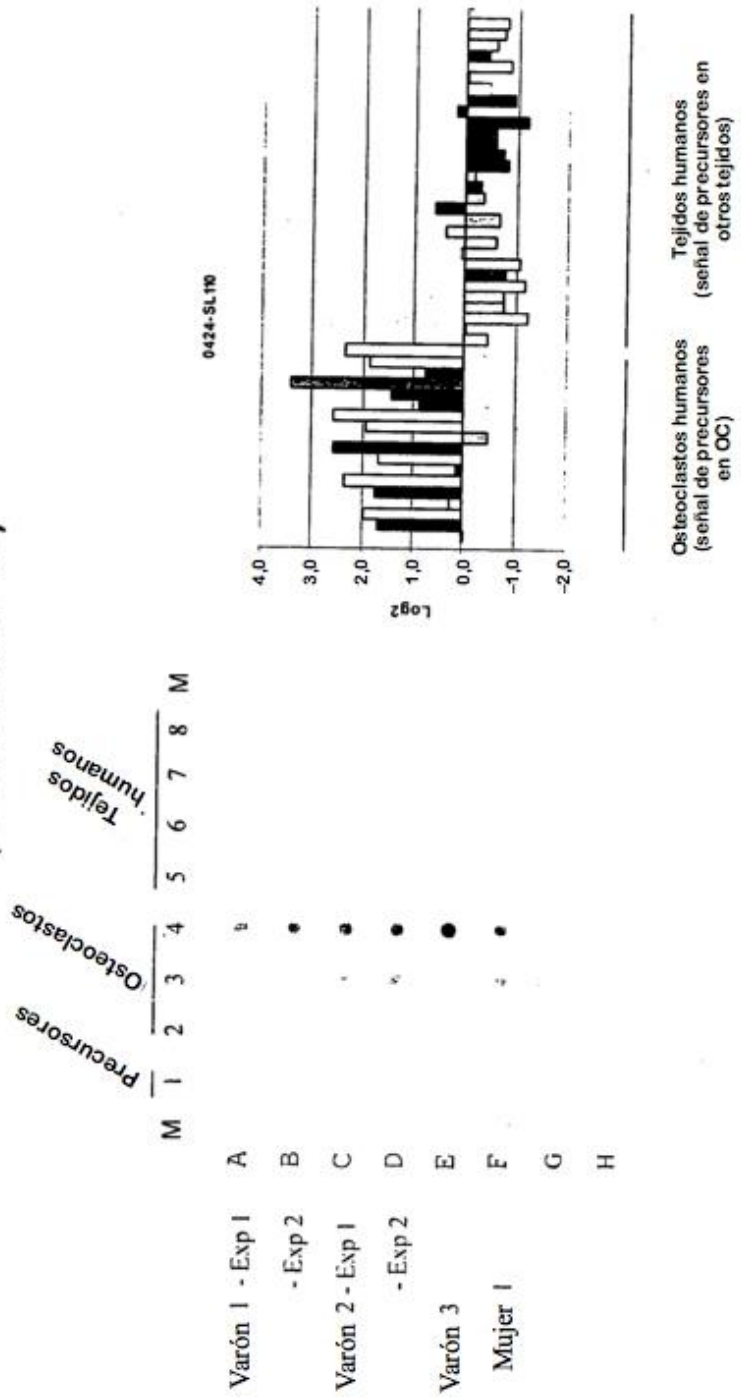


Fig. 10
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 10)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 11
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 11)

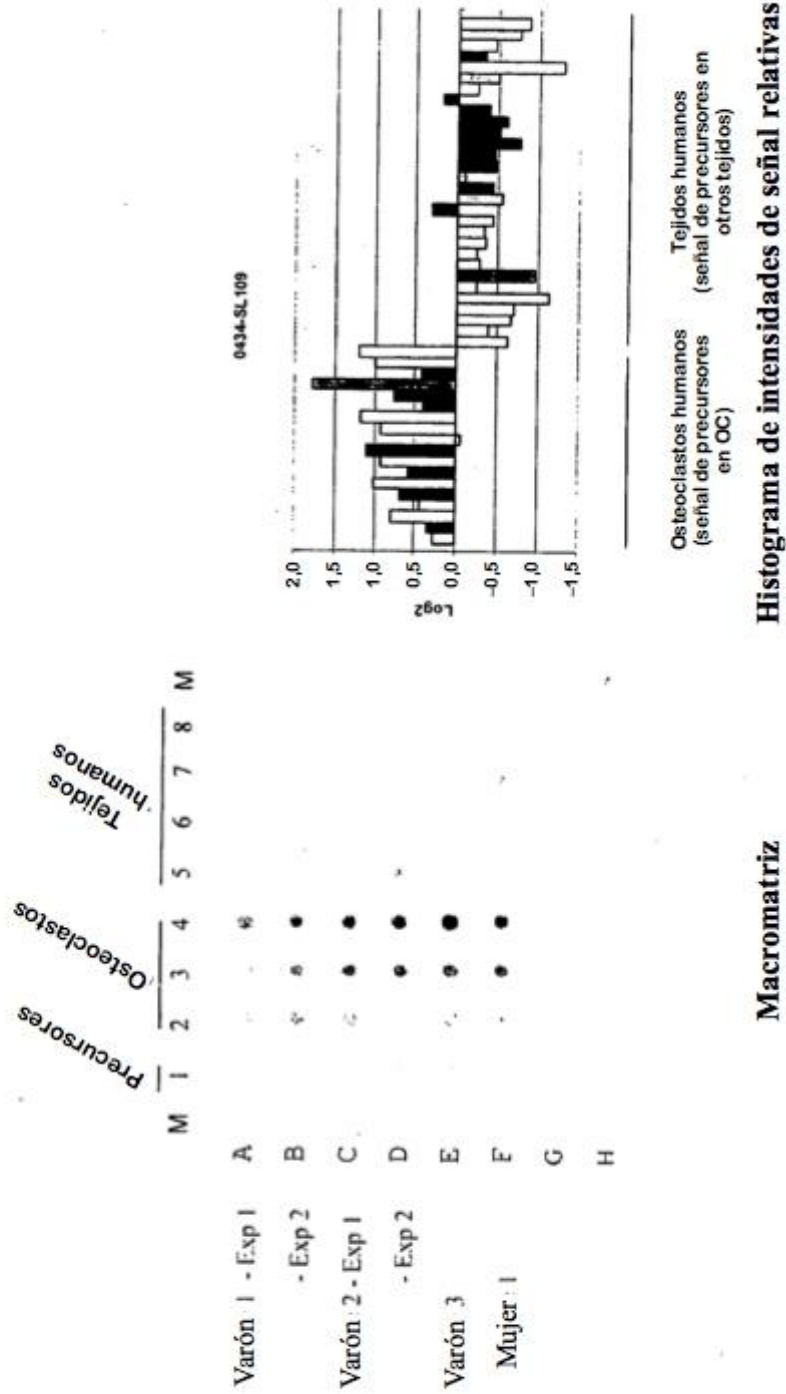
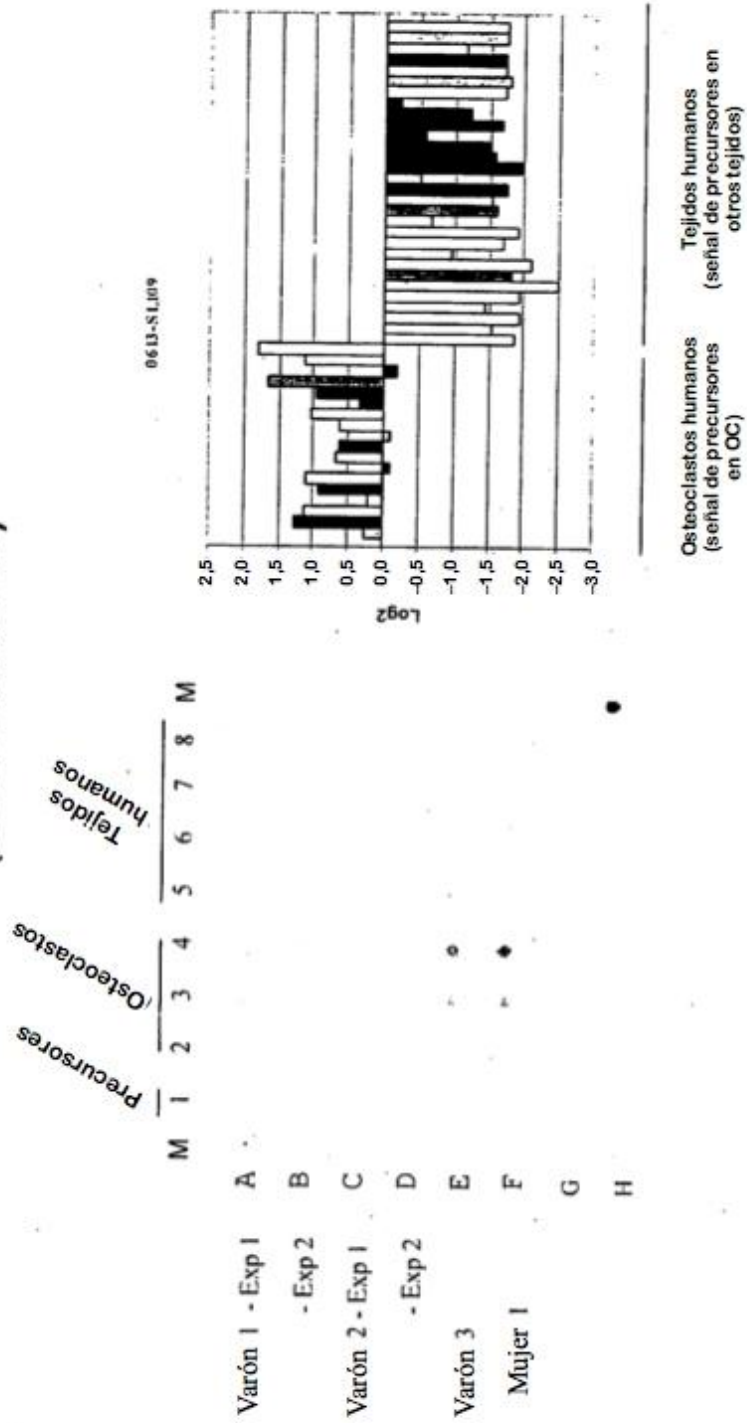


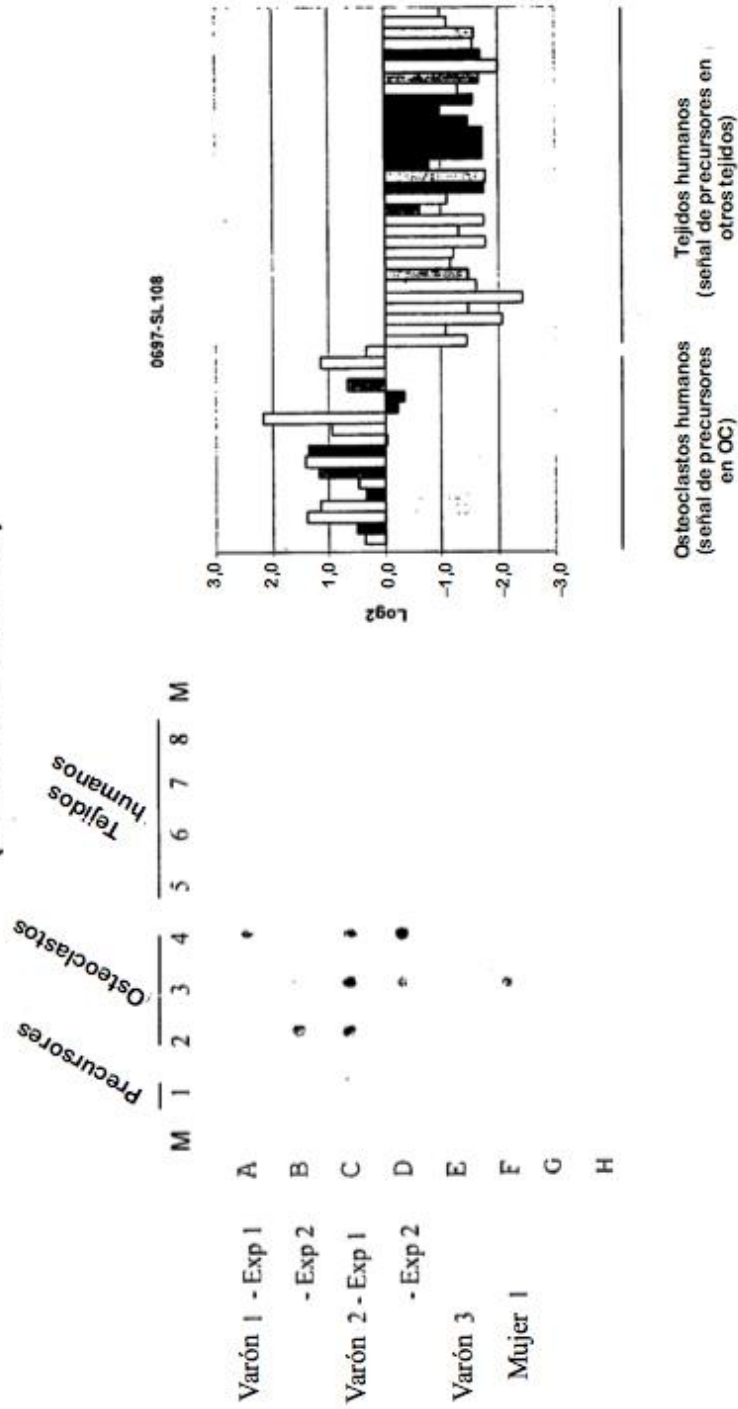
Fig. 12
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 12)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 13
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 13)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 14
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 14)

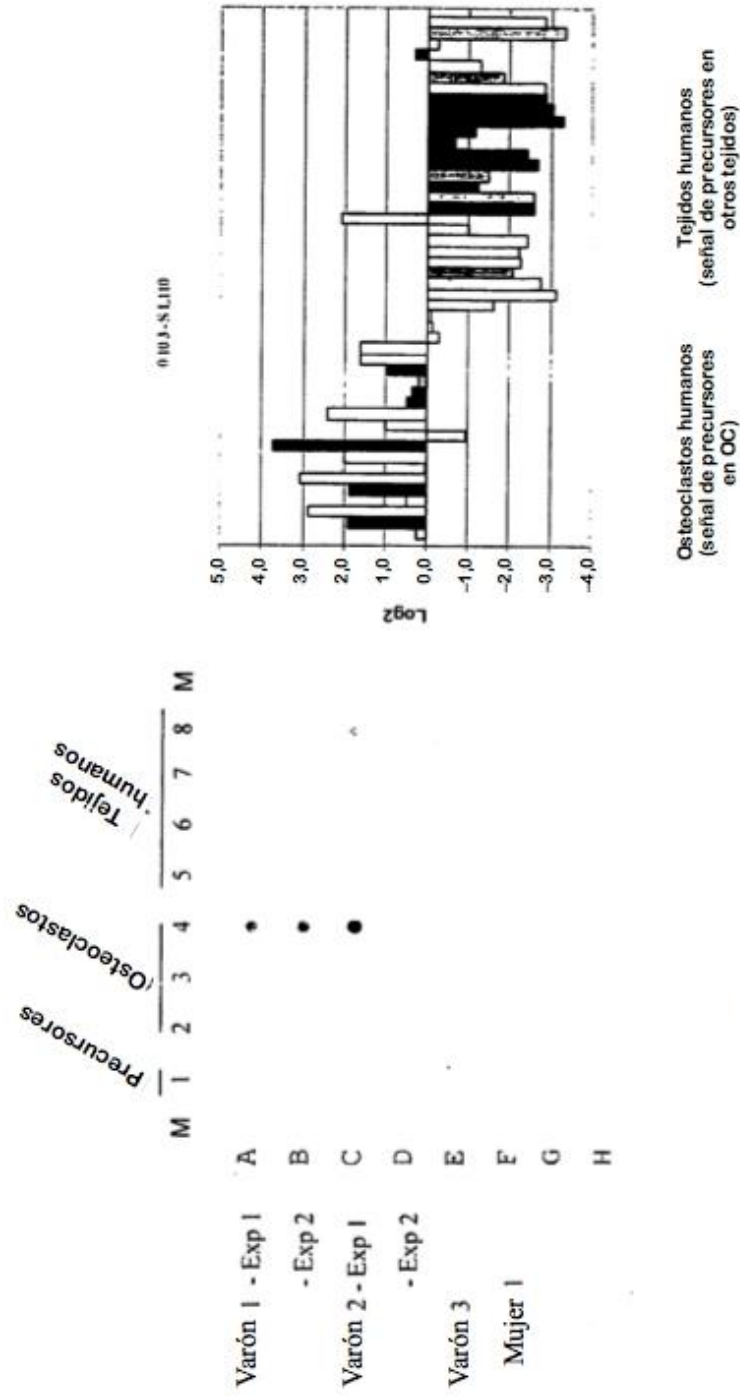
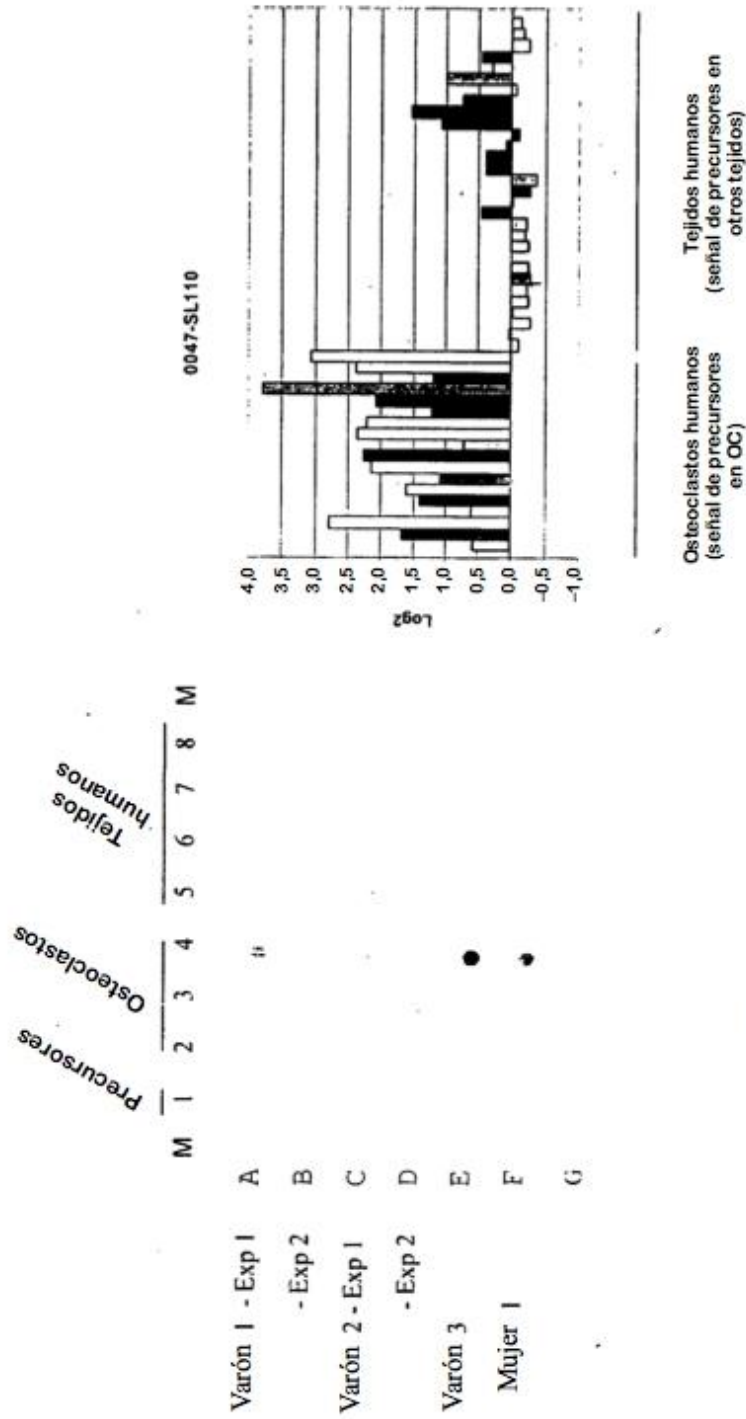


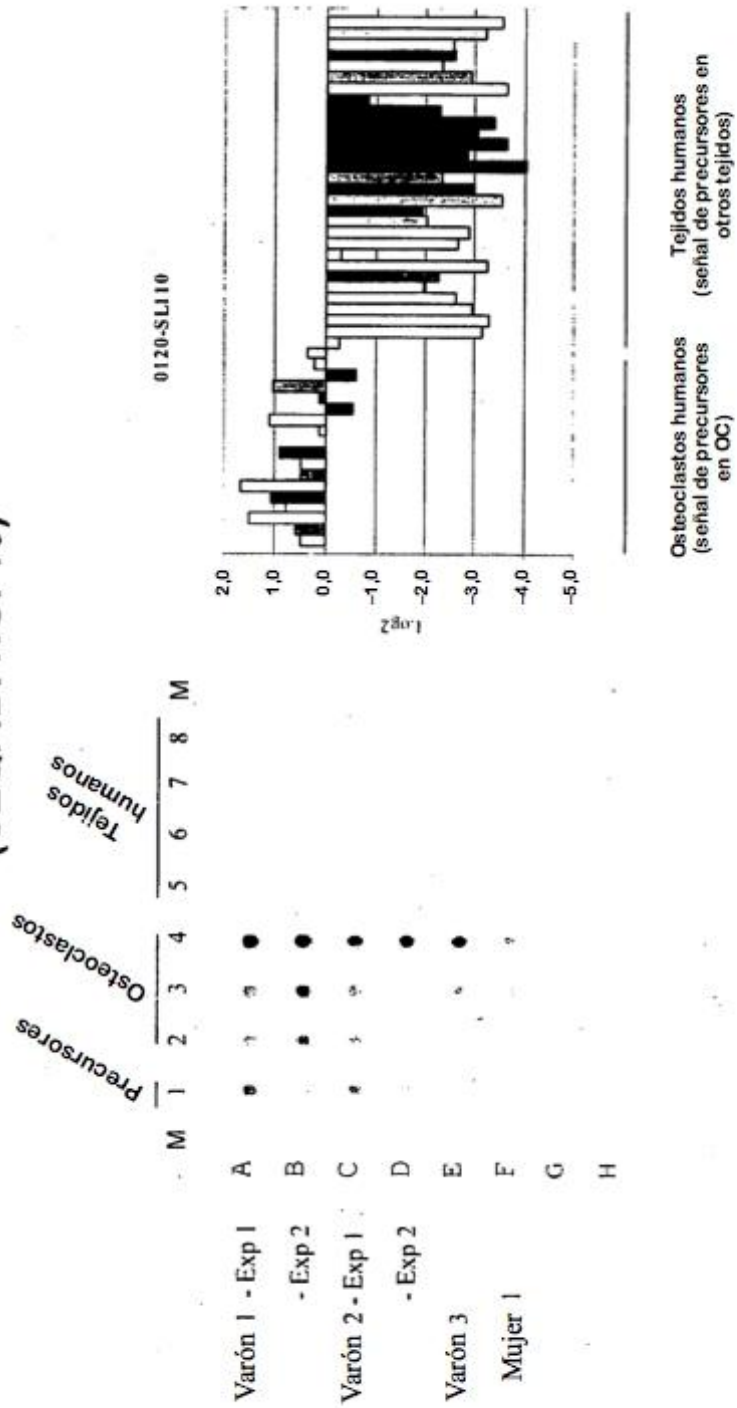
Fig. 15
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 15)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

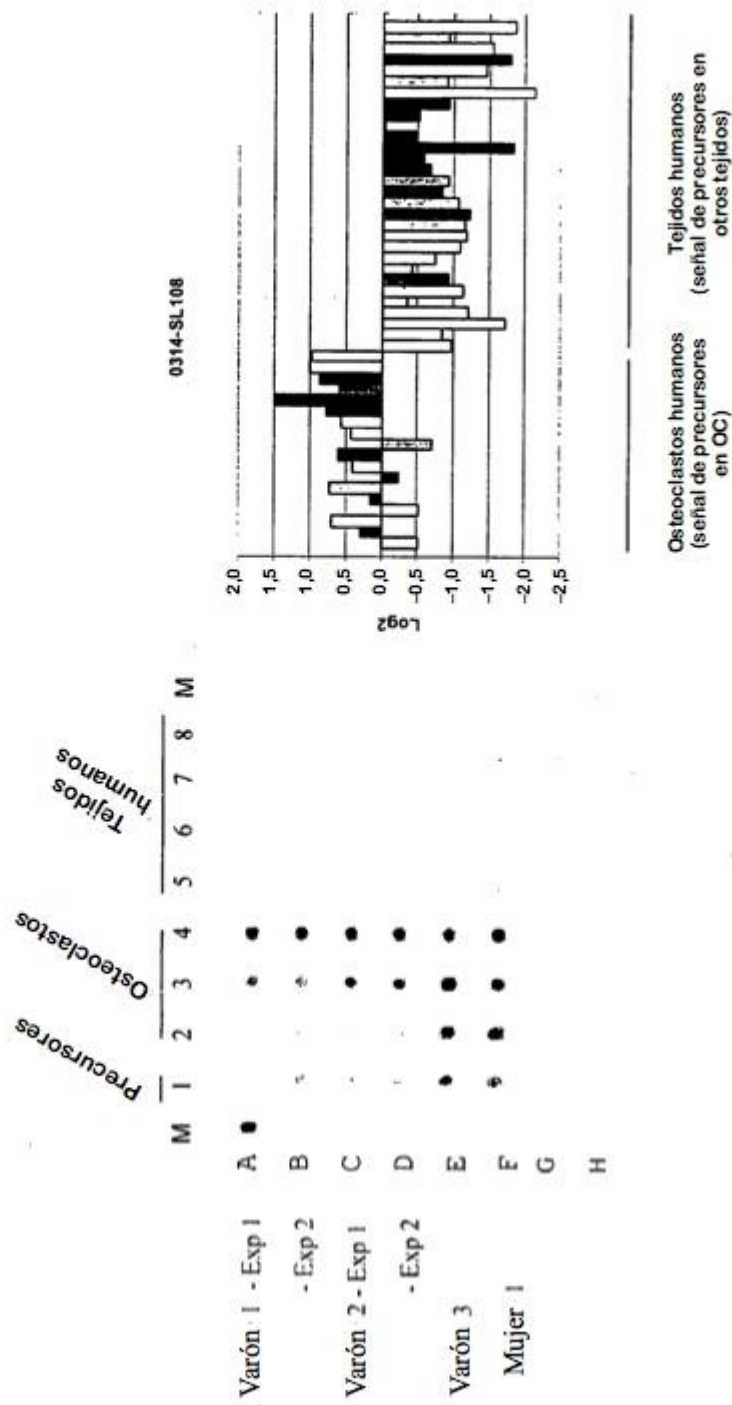
Fig. 16
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 16)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

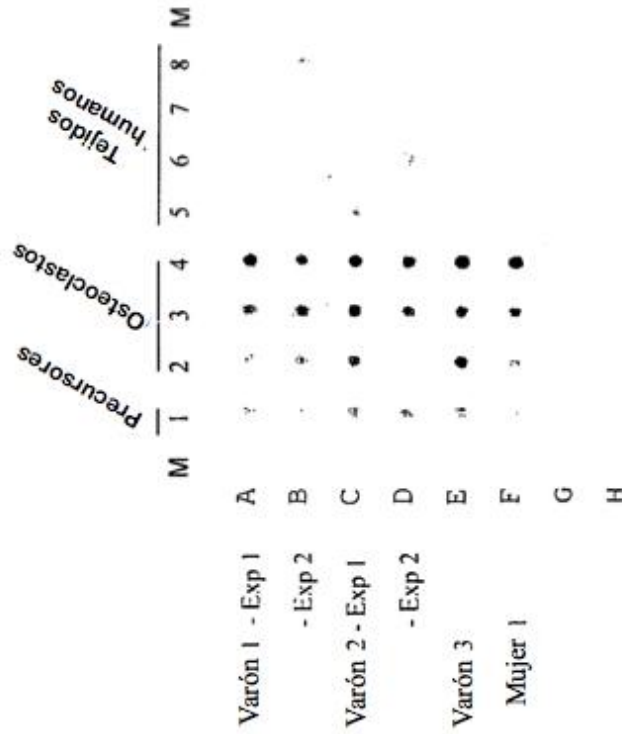
Fig. 17
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 17)



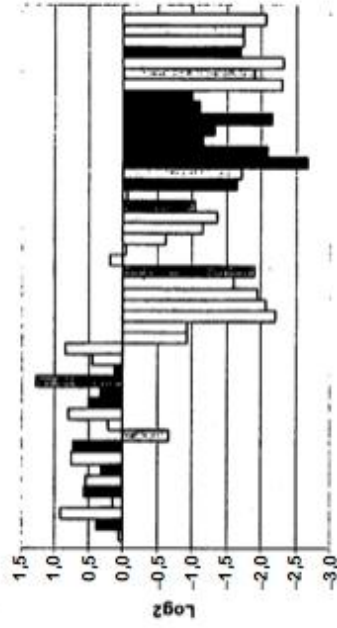
Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 18
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 18)



0421-SL110



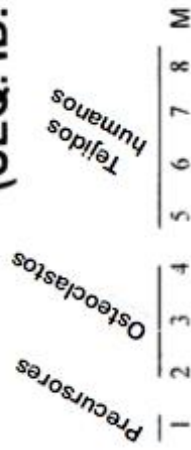
Osteoclastos humanos
 (señal de precursores
 en OC)

Tejidos humanos
 (señal de precursores en
 otros tejidos)

Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 19
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 19)



- A Varón 1 - Exp 1
- B - Exp 2
- C Varón 2 - Exp 1
- D - Exp 2
- E Varón 3
- F Mujer 1
- G
- H



Macromatriz Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 20
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 20)

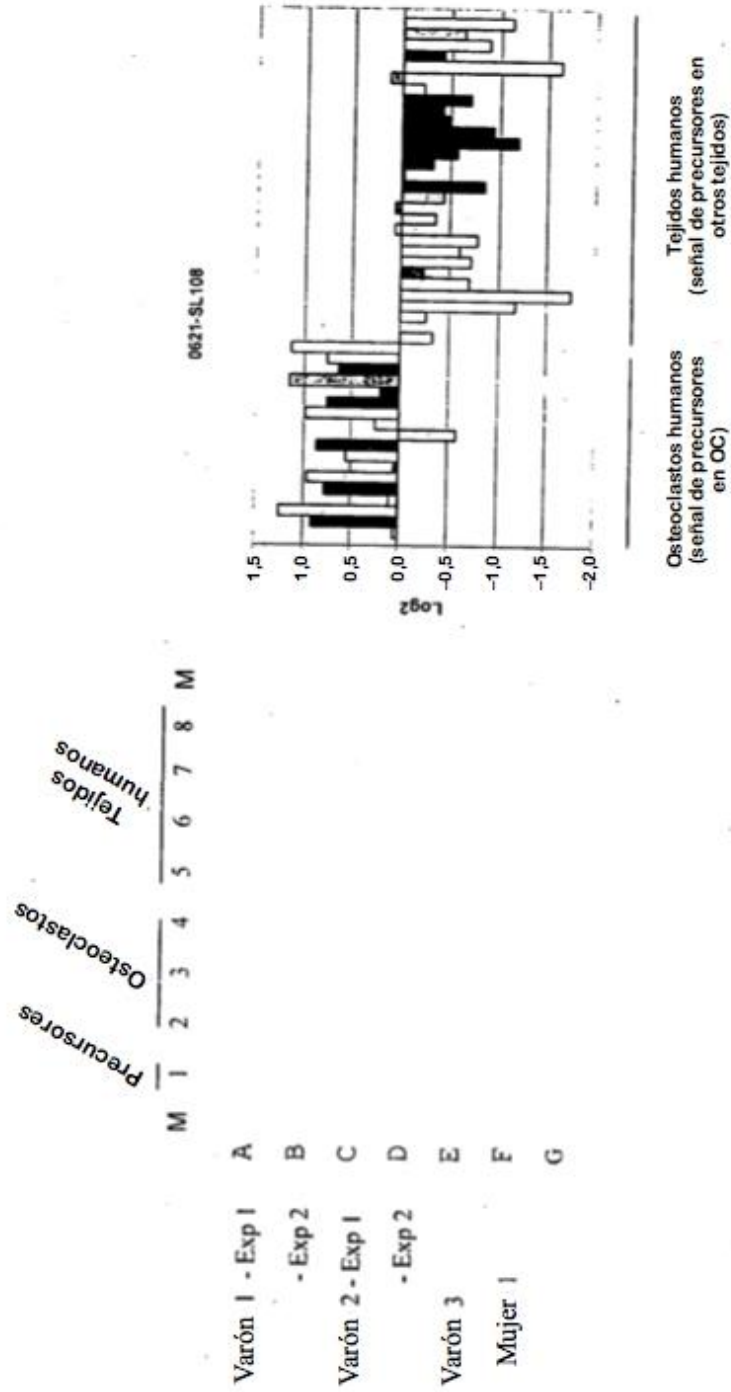
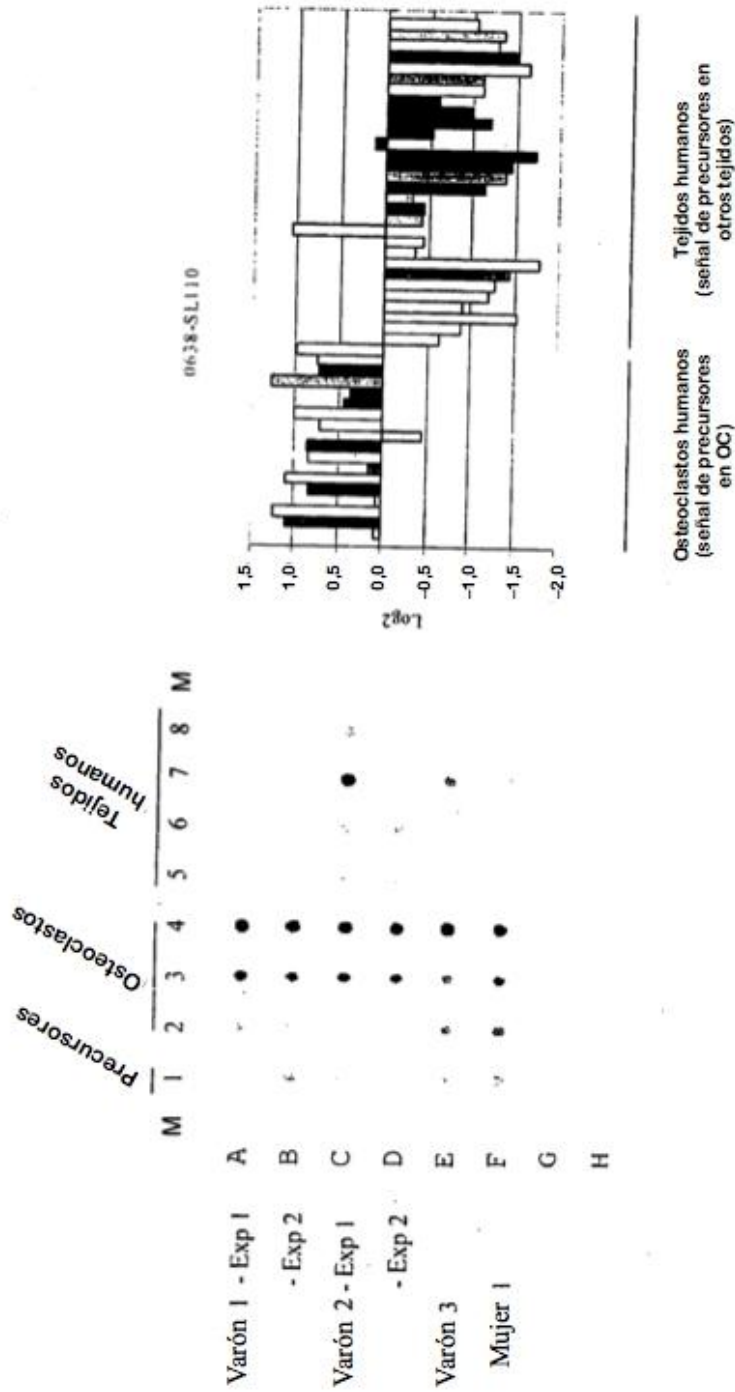
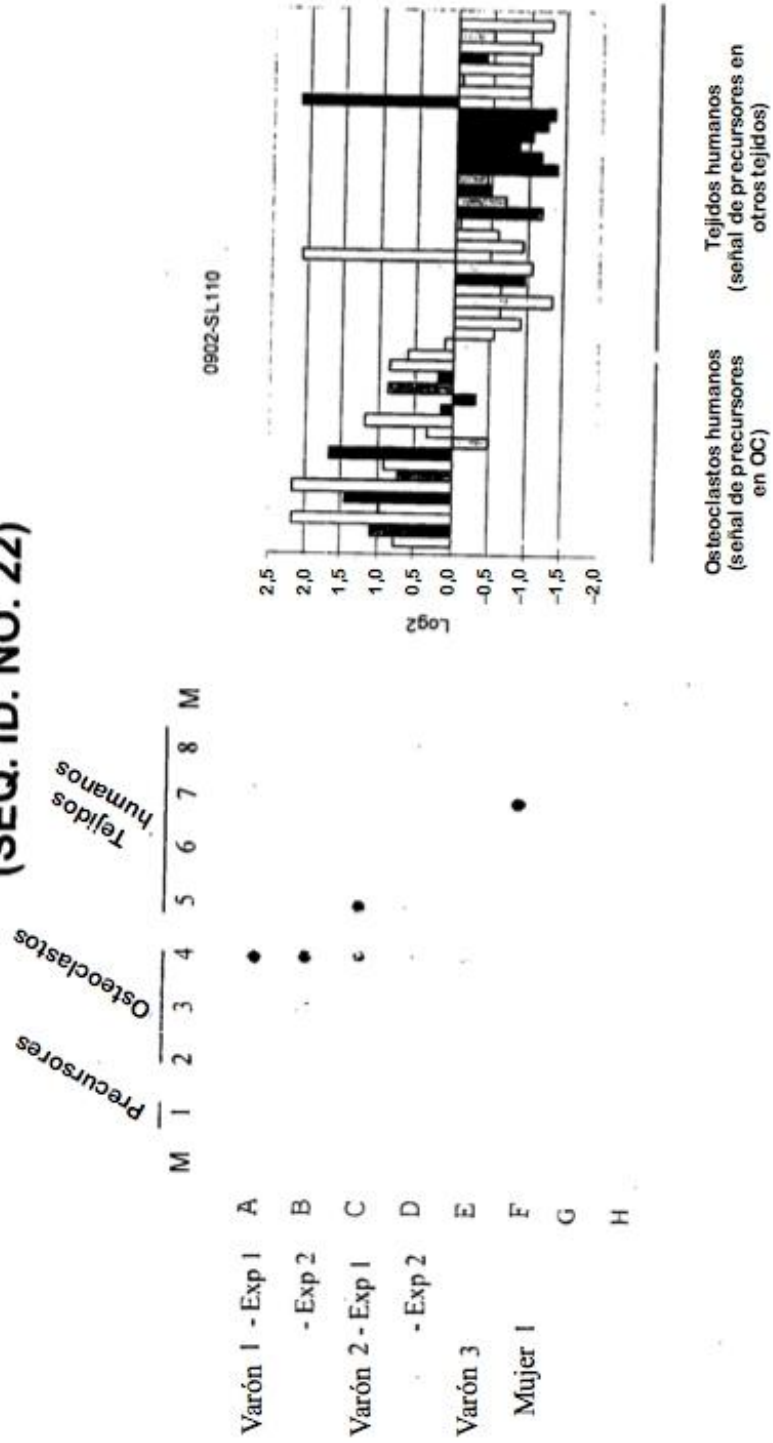


Fig. 21
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 21)



Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

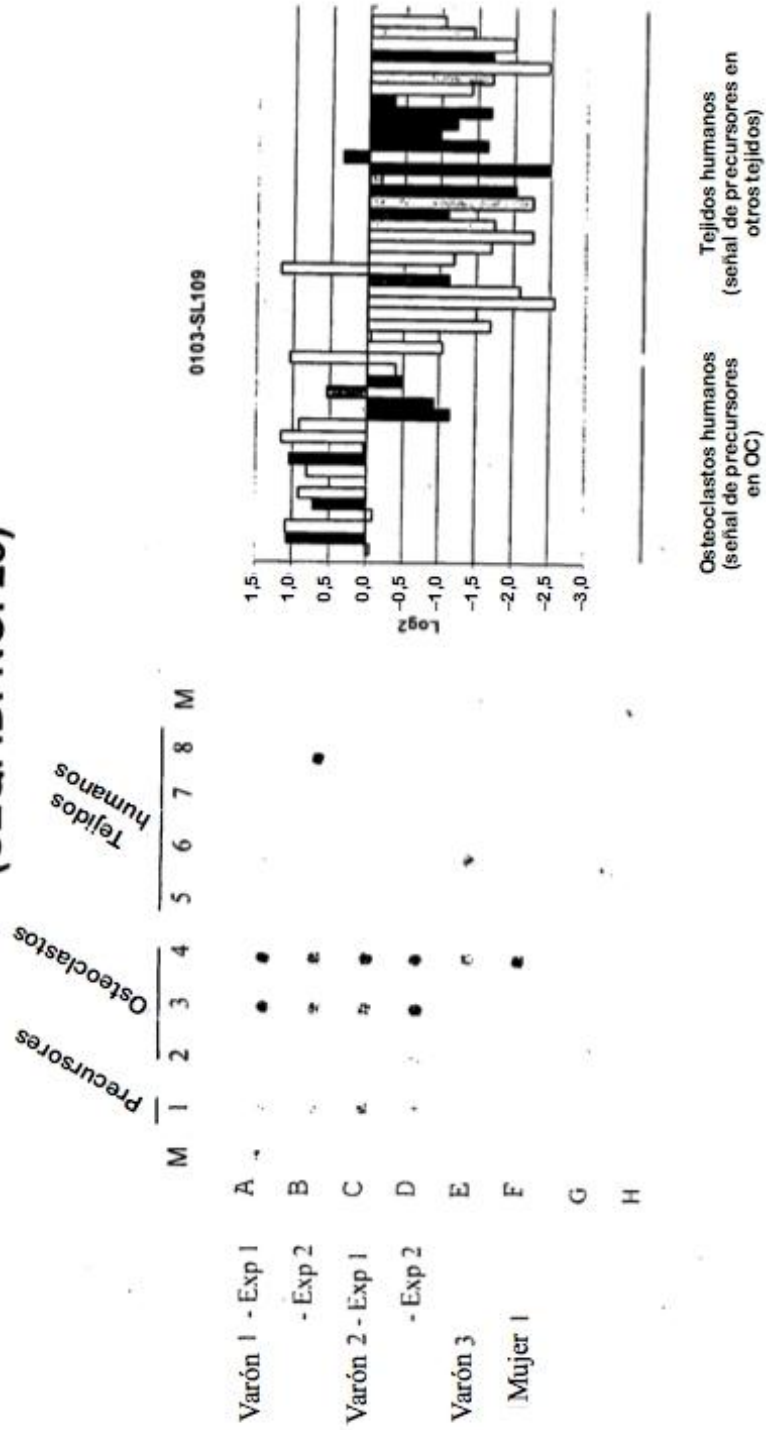
Fig. 22
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 22)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

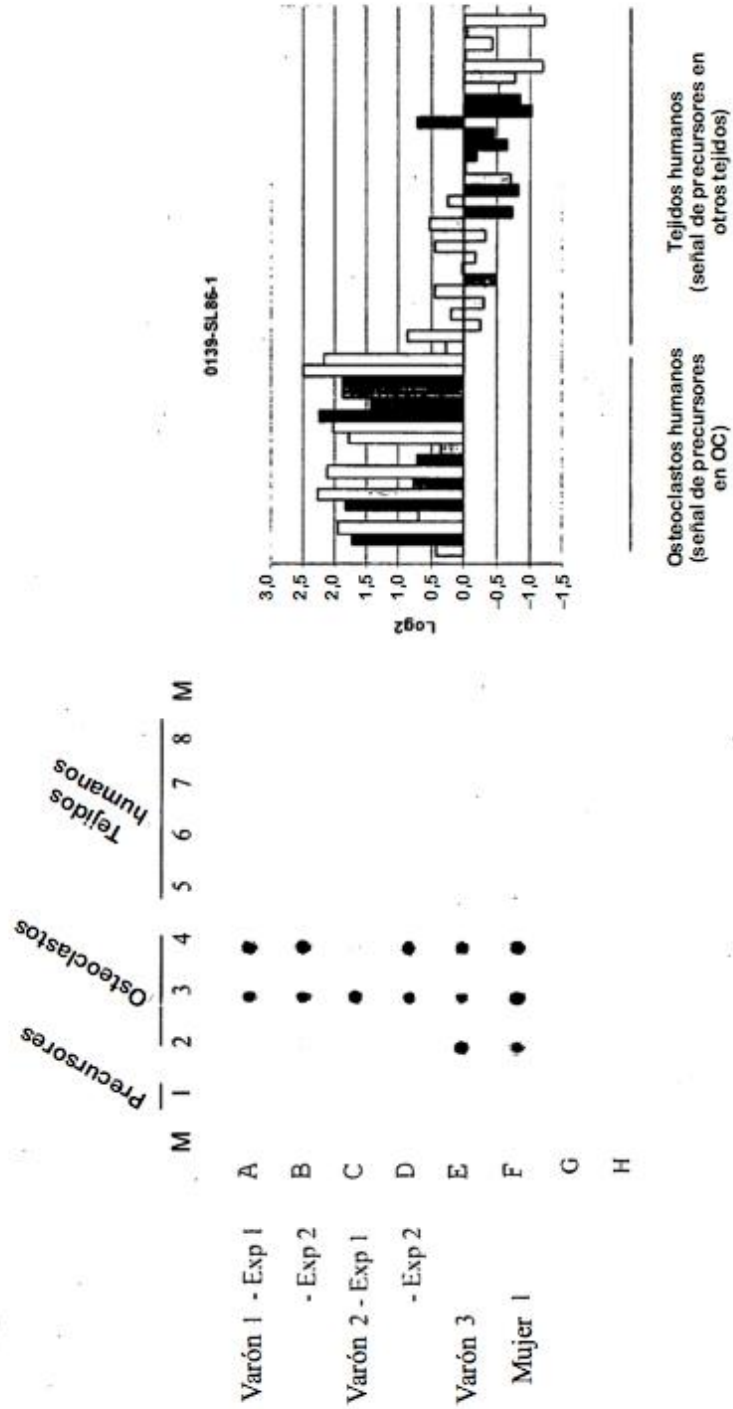
Fig. 23
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 23)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

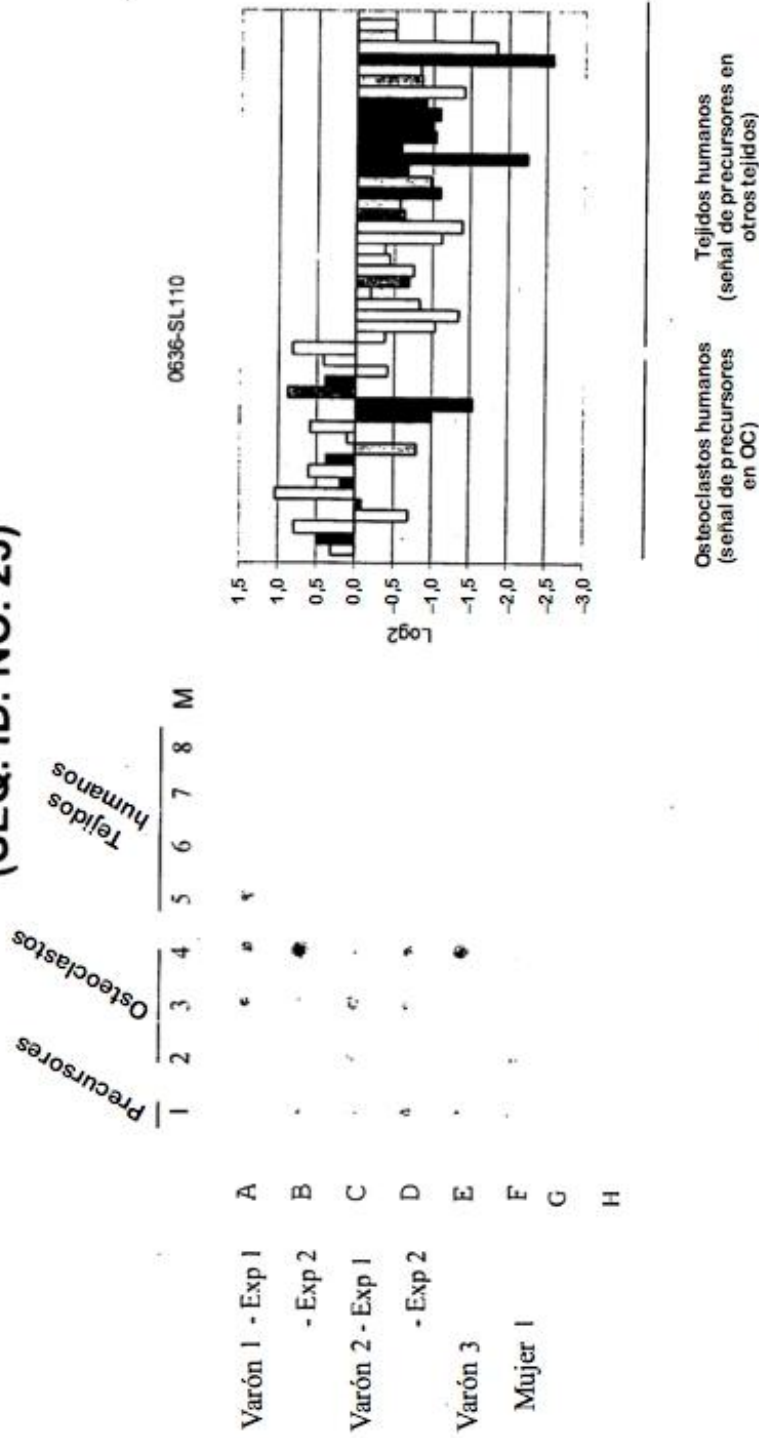
Fig. 24
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 24)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 25
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 25)

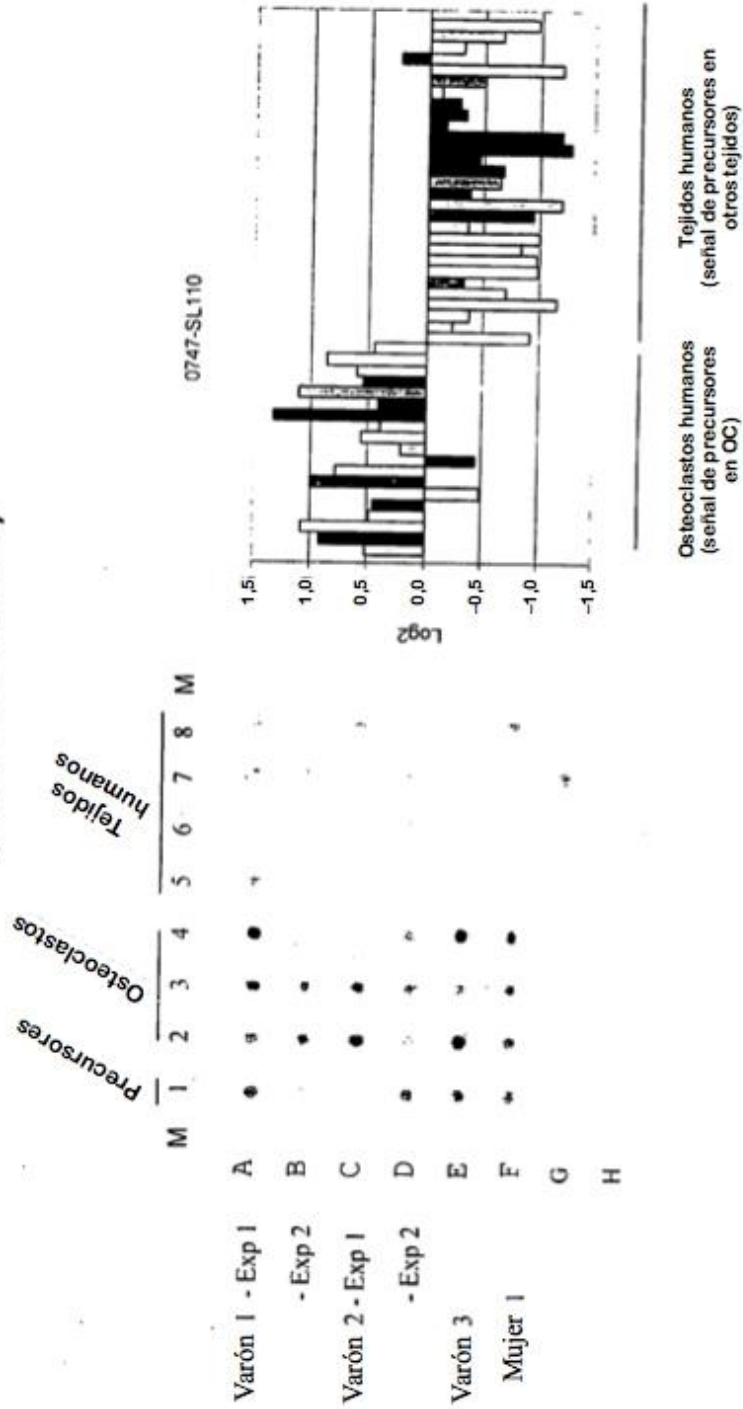


Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

Osteoclastos humanos
(señal de precursores
en OC)

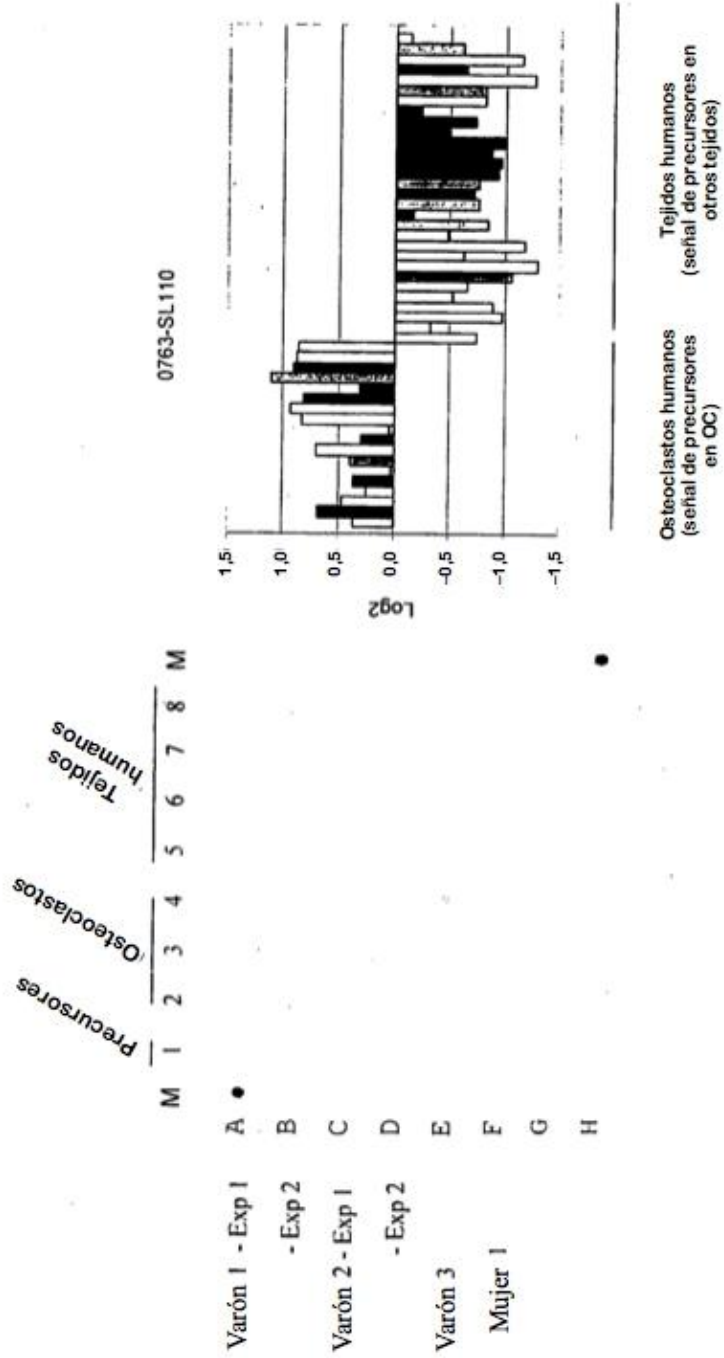
Tejidos humanos
(señal de precursores en
otros tejidos)

Fig. 26
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 26)



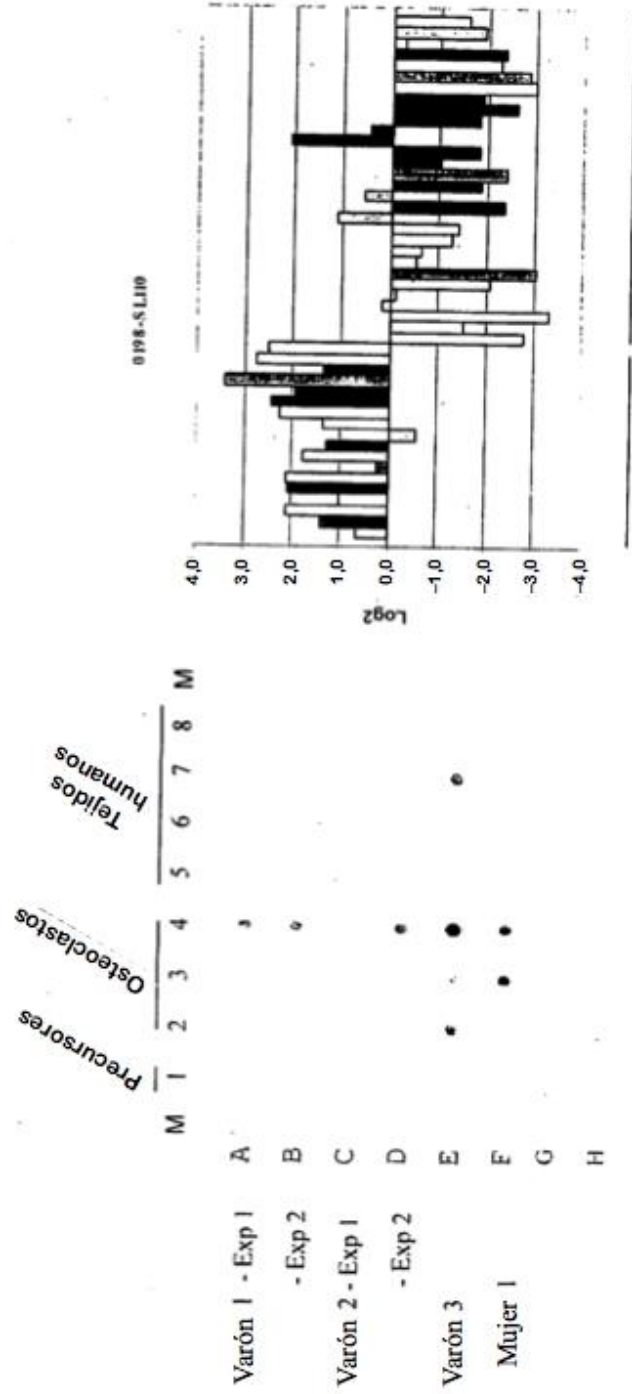
Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

Fig. 27
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 27)

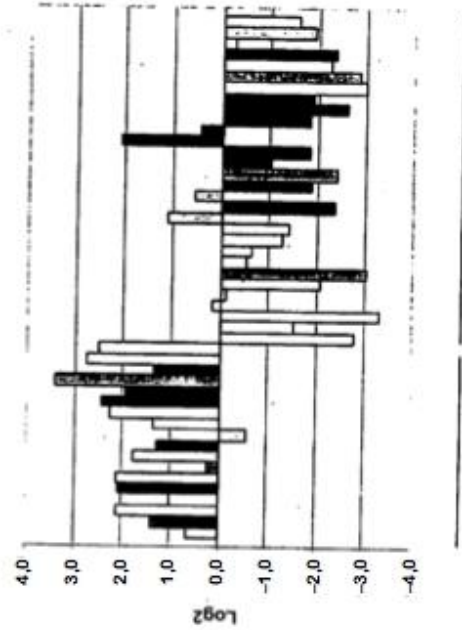


Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

Fig. 28
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 28)



0 198-S L110



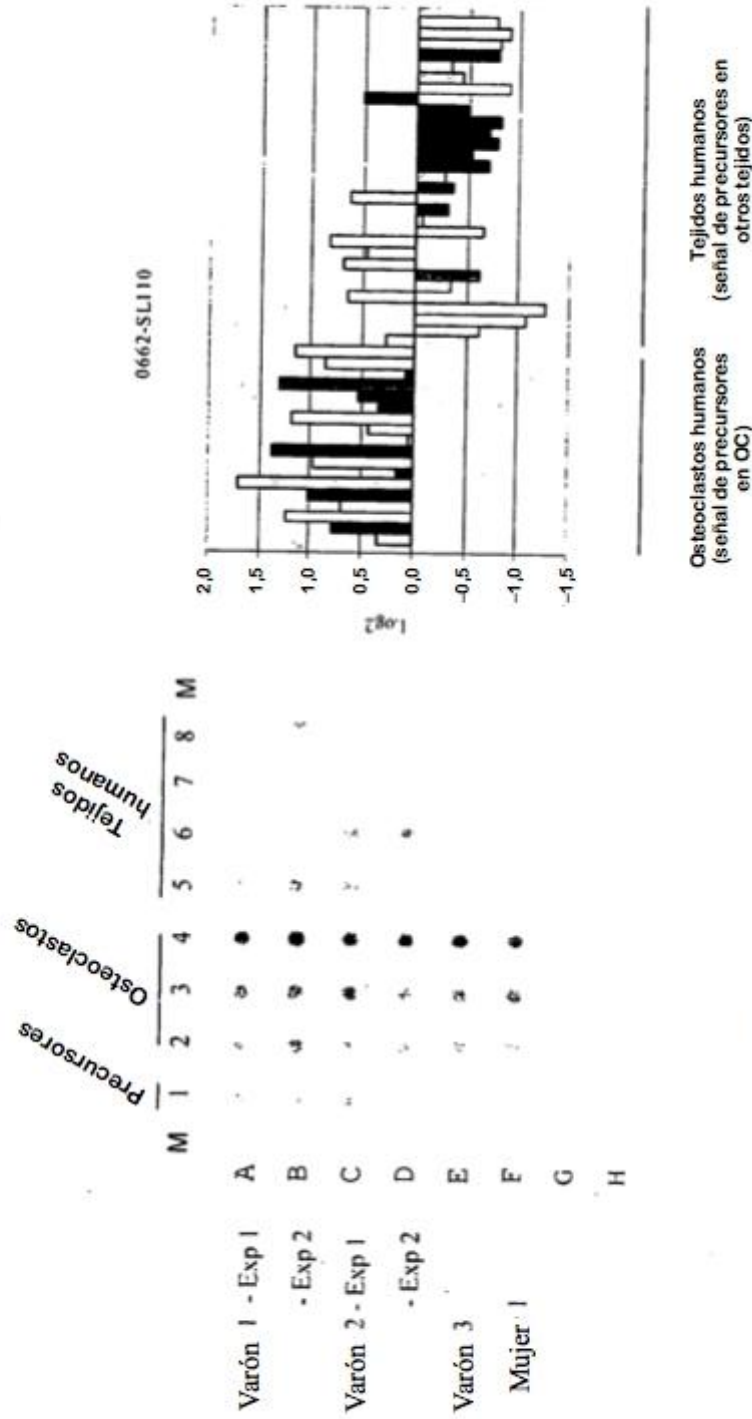
Osteoclastos humanos
 (señal de precursores
 en OC)

Tejidos humanos
 (señal de precursores en
 otros tejidos)

Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

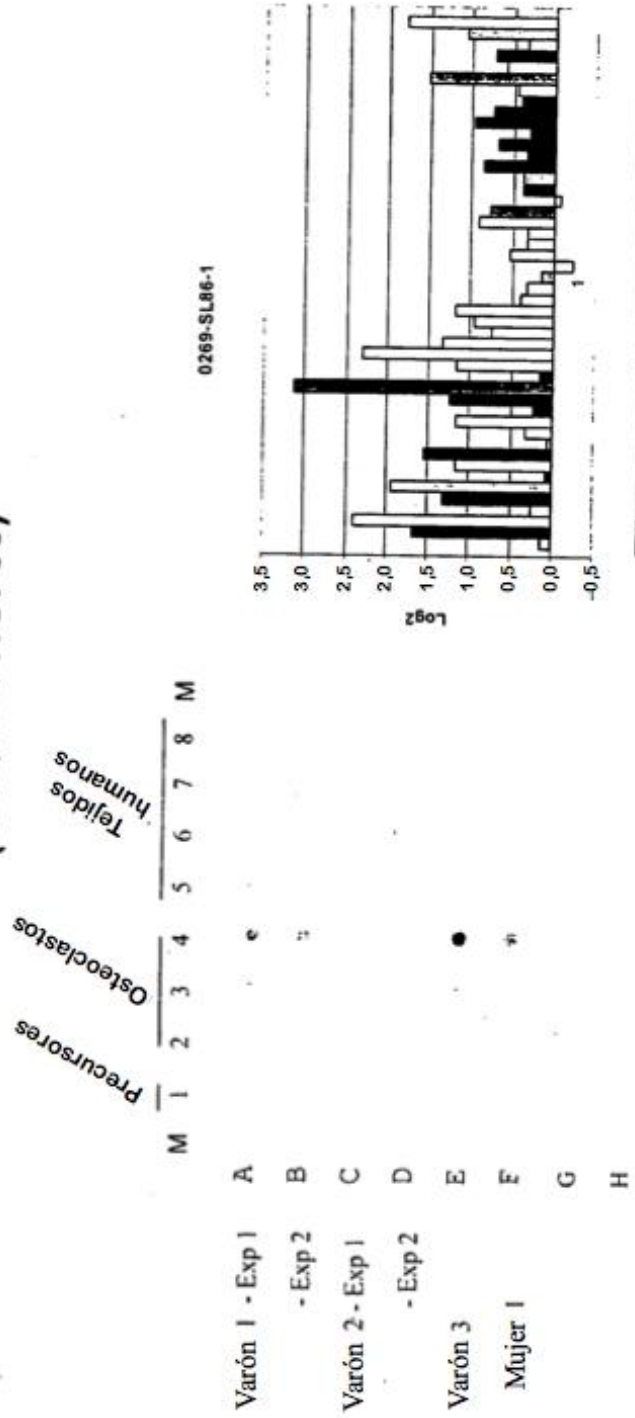
Fig. 29
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 29)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 30
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 30)



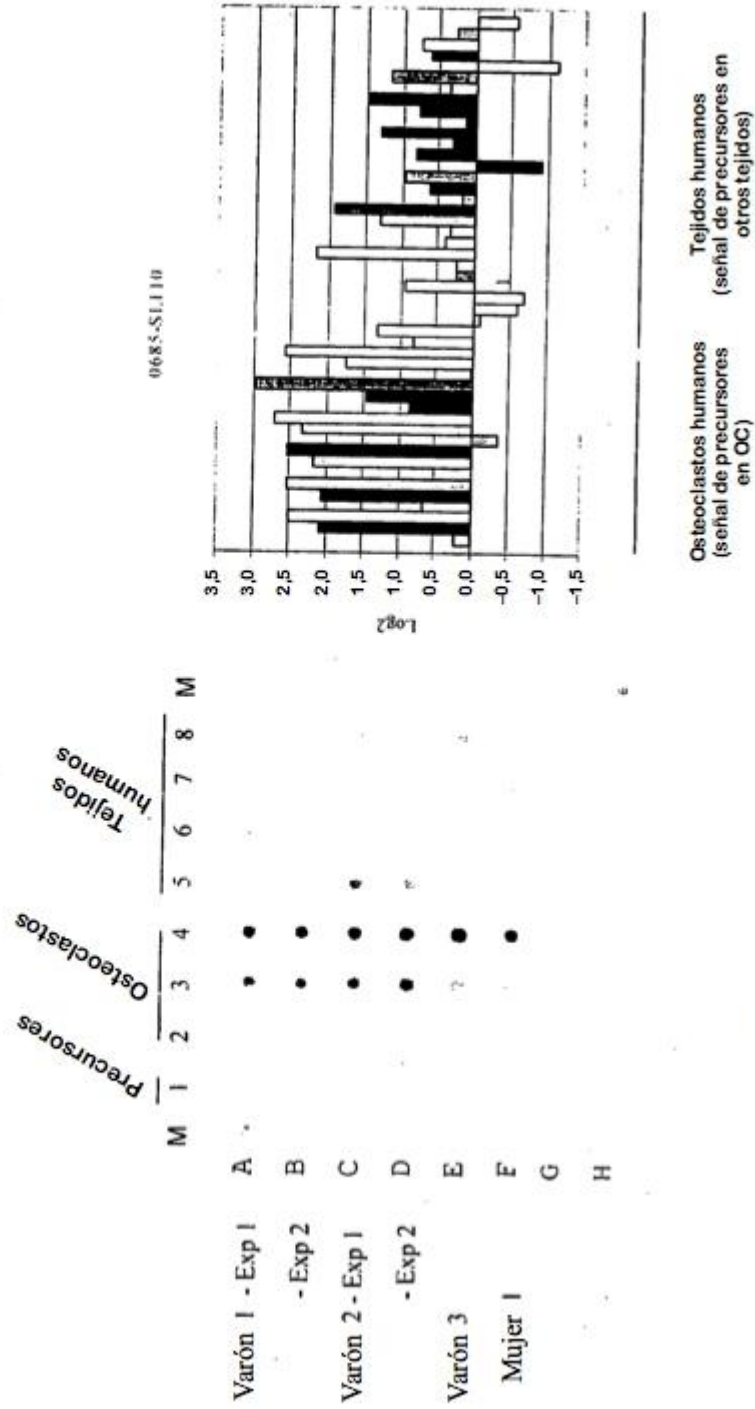
Osteoclastos humanos (señal de precursores en OC)

Tejidos humanos (señal de precursores en otros tejidos)

Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 31
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 31)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 32
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 32)

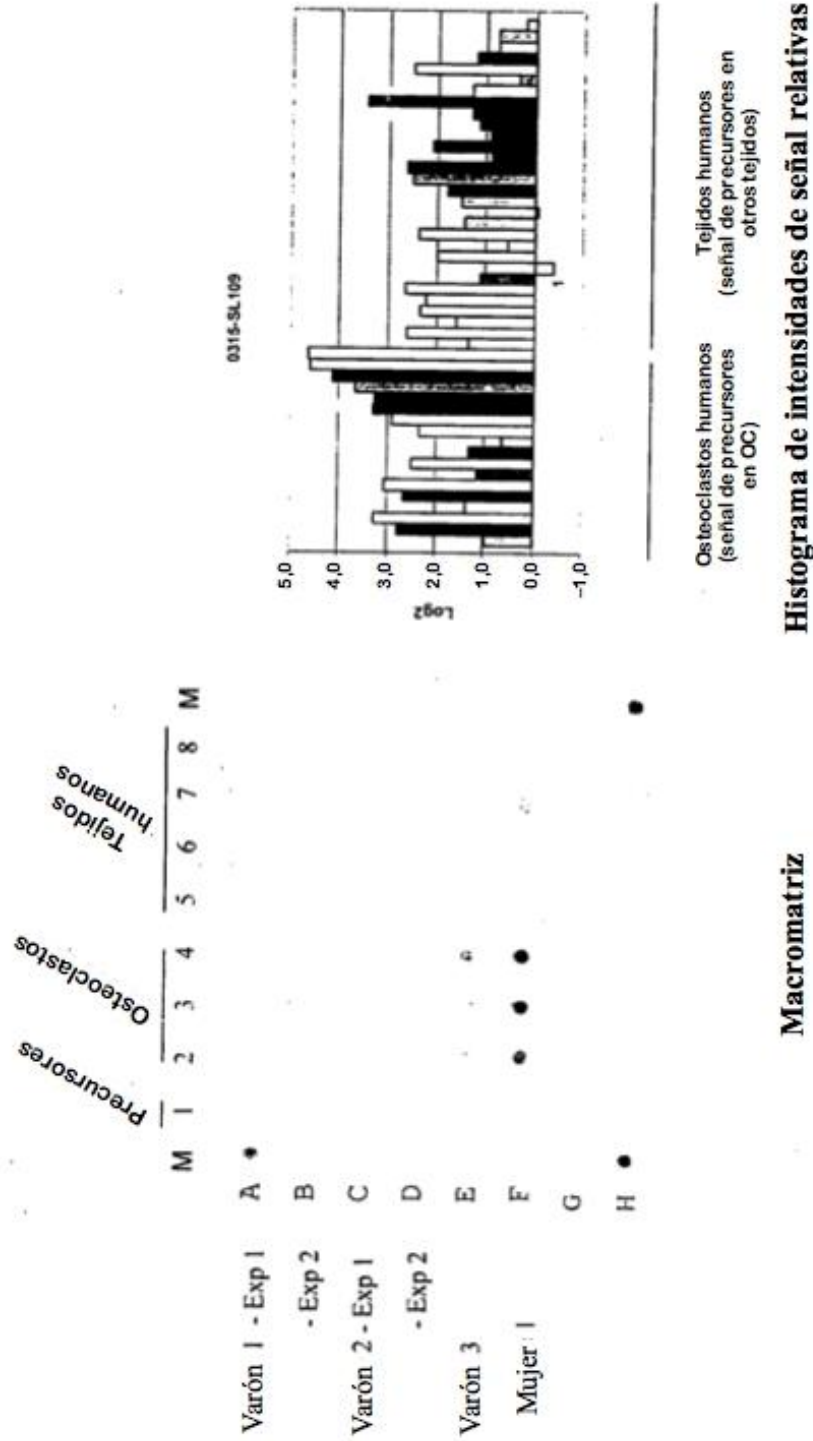
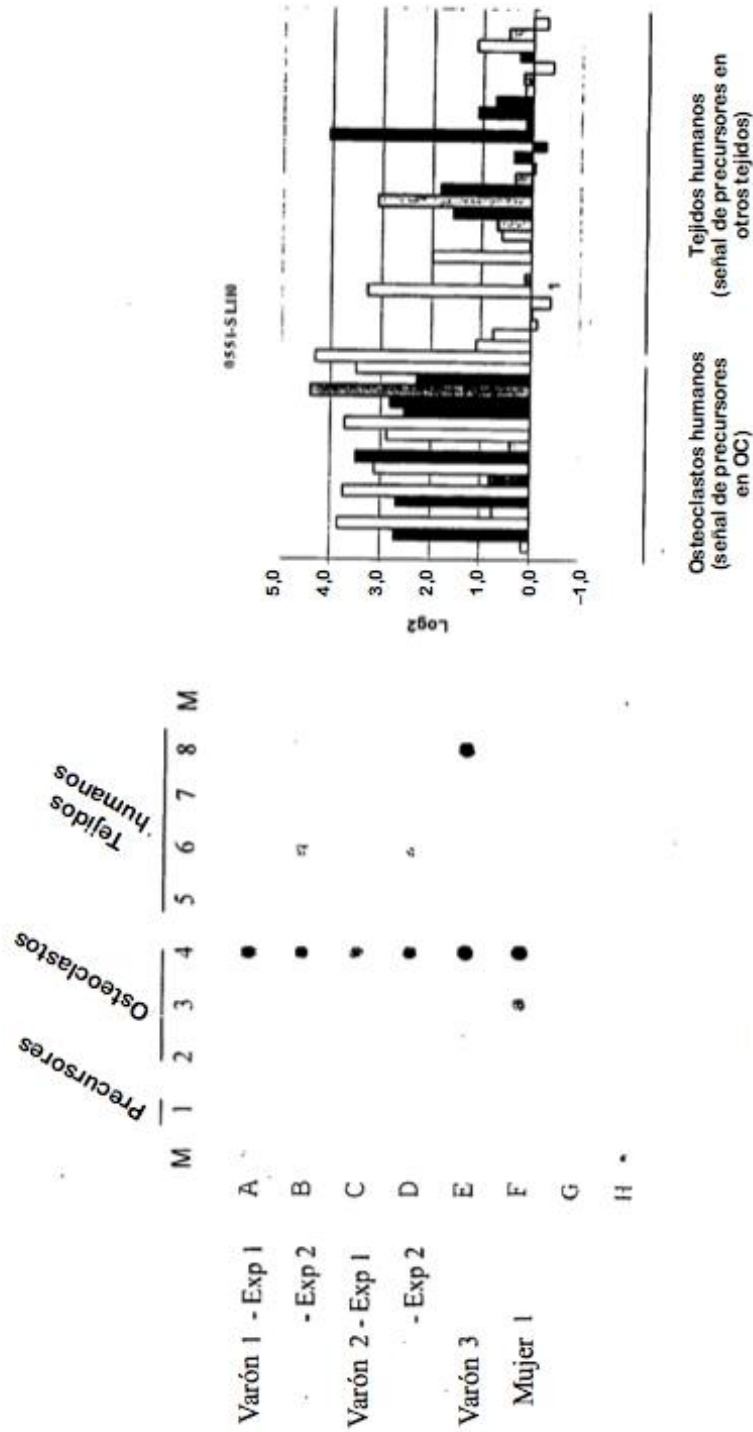
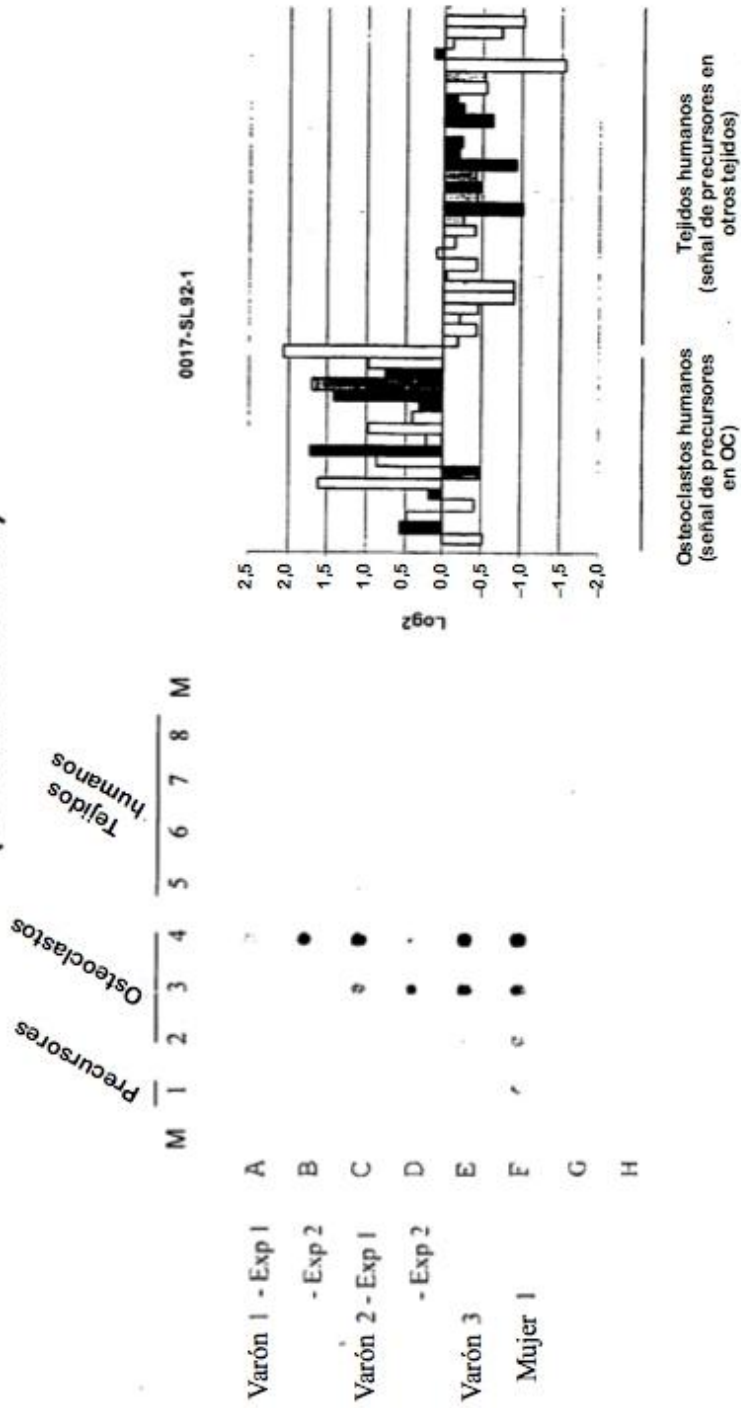


Fig.33
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 33)



Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

Fig. 34
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 34)



Macromatriz **Histograma de intensidades de señal relativas**

Fig. 35
Se necesitan AB0326 y AB0369 para la
diferenciación de los osteoclastos humanos

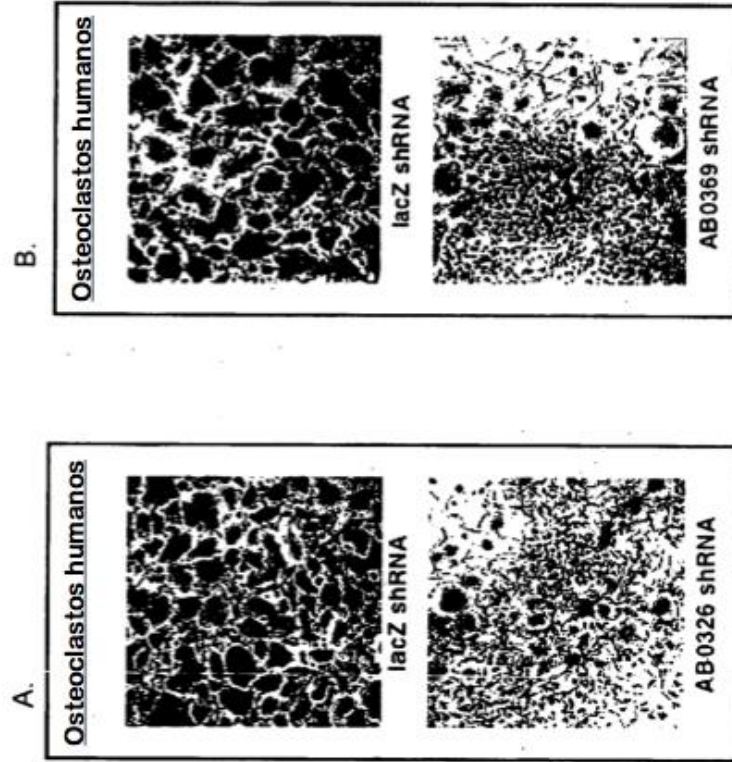


Fig. 36
Los efectos inactivadores de la osteoclastogénesis debidos al ortólogo de ratón de AB0326 (SEQ ID n.º 35) en el modelo RAW 264.7

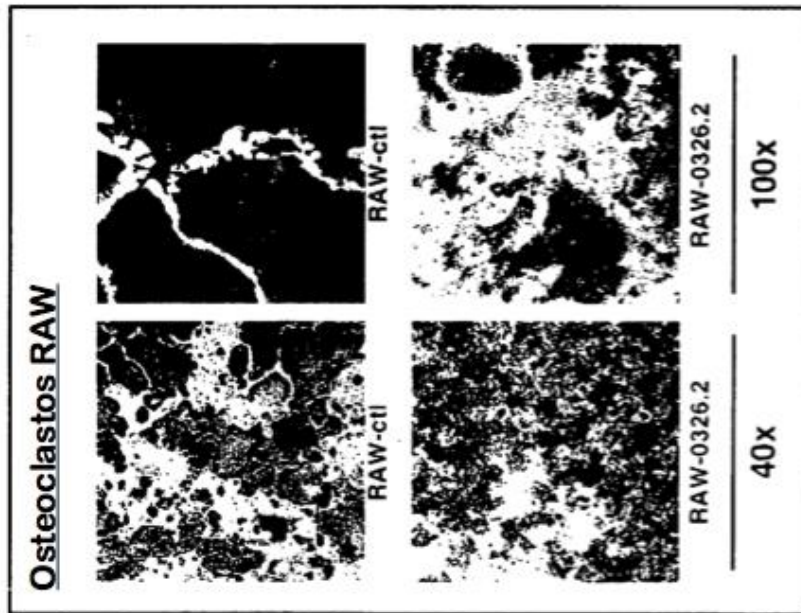


Fig. 37

Ensayo de complementación funcional para la SEQ ID n.º 1 (AB0326) en las células RAW-0326.2 para el escrutinio de inhibidores de la osteoclastogénesis

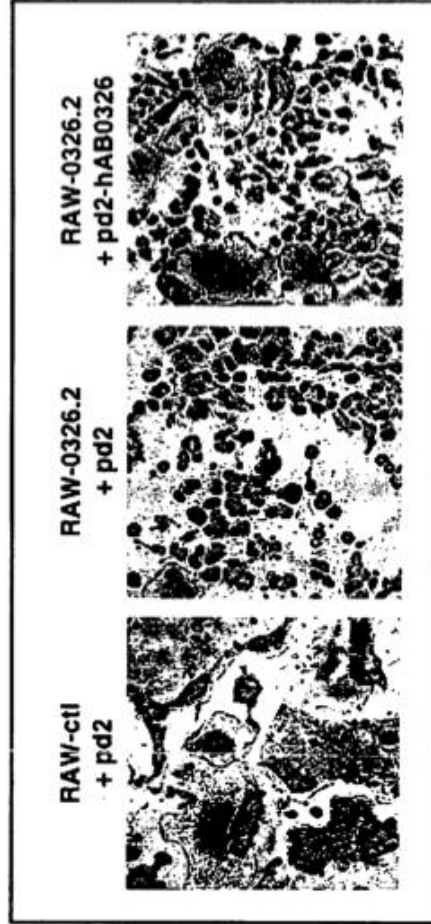
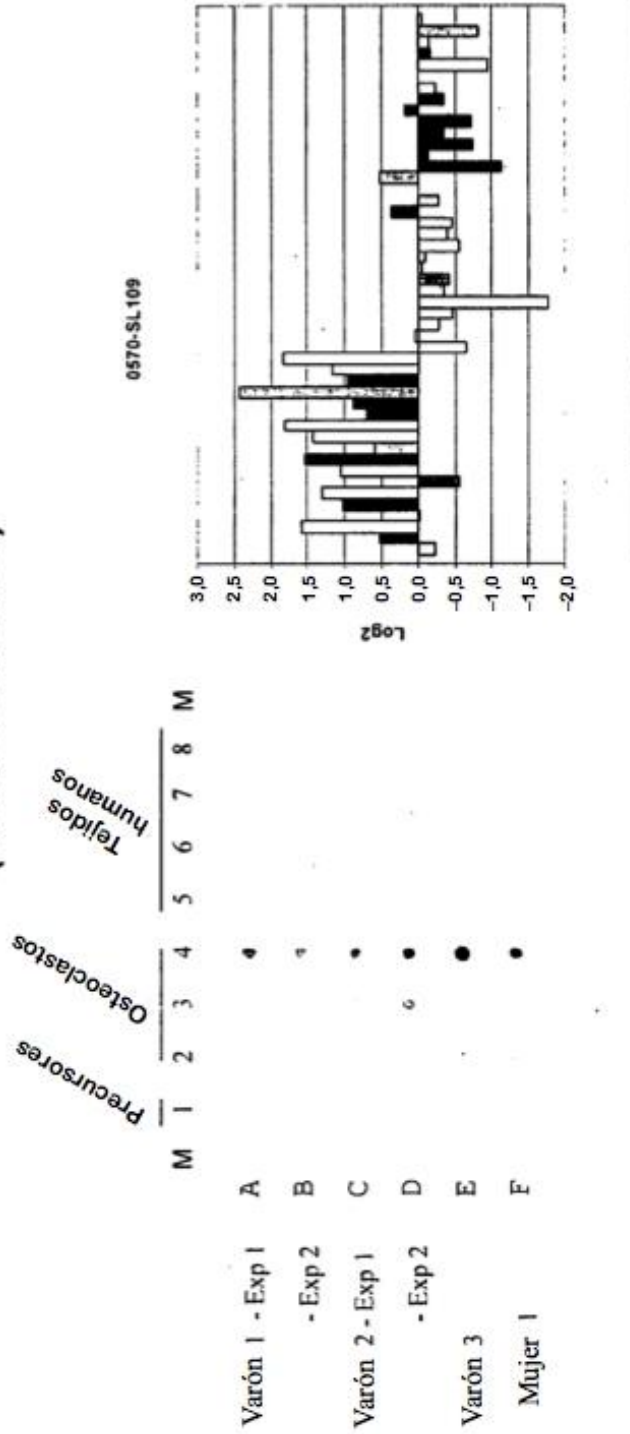


Fig. 38
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 85)



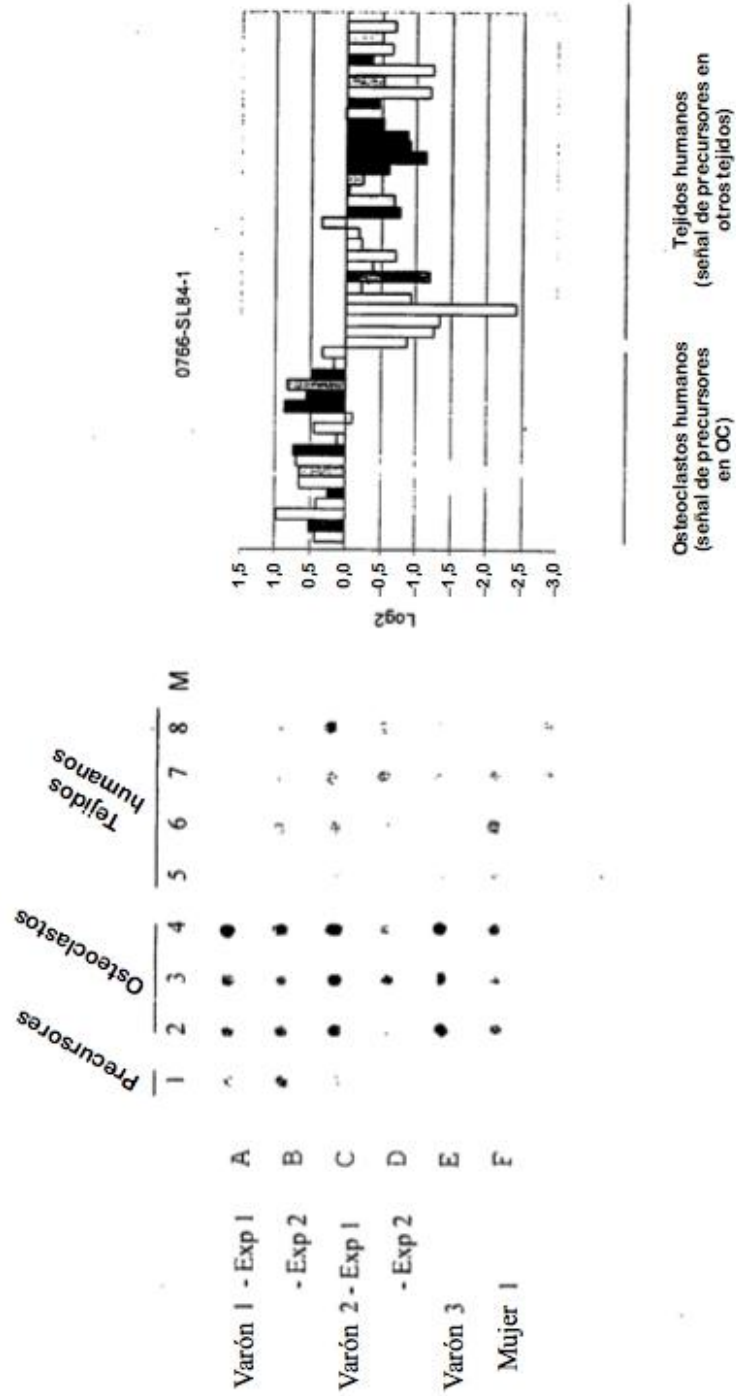
Osteoclastos humanos (señal de precursores en OC)

Tejidos humanos (señal de precursores en otros tejidos)

Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas

Fig. 39
Macromatriz de osteoclastos humanos
(SEQ. ID. NO. 86)



Macromatriz

Histograma de intensidades de señal relativas